

**Die Expression des Chemokinrezeptors XCR1
kennzeichnet kreuzpräsentierende dendritische Zellen
der Maus und des Menschen**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)
im Fach Biologie

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt-Universität zu Berlin

von
Diplom-Biologin Annabell Bachem

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz
Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Prof. Stefan Hecht, Ph.D.

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. Richard Lucius
 2. Prof. Dr. Richard A. KroczeK
 3. Dr. Michal Or-Guil

Tag der mündlichen Prüfung: 31.01.2013

*Die Natur ist unerbittlich und unveränderlich,
und es ist ihr gleichgültig, ob die verborgenen Gründe und Arten ihres Handelns
dem Menschen verständlich sind oder nicht.*

(Galileo Galilei, 1564-1642)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	V
Tabellenverzeichnis.....	VII
Abkürzungsverzeichnis.....	IX
 Zusammenfassung	 1
Abstract	3
 1 Einleitung.....	 5
1.1 Dendritische Zellen	5
1.1.1 Murine dendritische Zellsubtypen	6
1.1.1.1 Besondere Eigenschaften der CD8-positiven dendritischen Zellen der Milz	8
1.1.2 Dendritische Zellen des humanen peripheren Blutes	9
1.2 Die Kreuzpräsentation von Antigenen.....	11
1.3 Der Chemokinrezeptor XCR1	12
1.4 Ziel der Arbeit	14
2 Materialien und Methoden	15
2.1 Chemikalien und Plastikprodukte.....	15
2.2 Probenmaterialien	15
2.2.1 Mausstämme	15
2.2.2 Humane Blutpräparate	17
2.2.3 Monoklonale Antikörper	17
2.3 Molekularbiologische Methoden.....	19
2.3.1 Quantitative <i>real time</i> -Polymerase Kettenreaktion.....	19
2.3.2 Enzymgekoppelter Immunabsorptions Assay	21
2.4 Zellbiologische Methoden	21
2.4.1 Zelllinien und Zellkulturbedingungen	21
2.4.2 Herstellung und Kultivierung humaner CD8 ⁺ T-Zell-Klone	22
2.4.3 Herstellung von humanem zellassoziertem Antigen	22
2.4.4 Präparation primärer Zellen.....	22
2.4.4.1 Isolierung von Zellen aus murinen lymphoiden Organen	22
2.4.4.2 Isolierung von Zellen aus muriner Haut	23
2.4.4.3 Anreicherung dendritischer Zellen der murinen Milz	23
2.4.4.4 Magnetisch-aktivierte Zellsortierung muriner Proben.....	24
2.4.4.5 Isolierung von Zellpopulationen aus dem humanen peripheren Blut.....	25

2.4.4.6	Anreicherung mononukleärer Zellen aus dem peripheren Blut	25
2.4.4.7	Magnetisch-aktivierte Zellsortierung humaner Proben	26
2.4.4.8	Generierung von dendritischen Zellen aus Monozyten	26
2.5	Durchflusszytometrie	26
2.5.1	Färbung von Oberflächenantigenen	27
2.5.2	Durchflusszytometrische Messung	28
2.6	Funktionelle Analysen primärer dendritischer Zellen	29
2.6.1	Aufnahme von zellassoziertem Antigen durch murine dendritische Zellen.....	29
2.6.2	Kreuzpräsentation durch murine dendritische Zellen	29
2.6.3	Peptidpräsentation durch murine dendritische Zellen	29
2.6.4	Kreuzpräsentation durch humane dendritische Zellen	30
2.6.5	Peptidpräsentation durch humane dendritische Zellen	30
2.7	Flt3 Ligand Behandlung von Mäusen	31
2.8	Statistik	31
3	Ergebnisse.....	32
3.1	Phänotypisierung XCR1-exprimierender Zellen der murinen Milz	32
3.1.1	Der Chemokinrezeptor XCR1 wird spezifisch auf der Zelloberfläche von CD8 ⁺ und DN konventionellen dendritischen Zellen exprimiert	32
3.1.2	Die Expression von XCR1 auf dendritischen Zellen korreliert mit CD8, CD205 sowie Clec9A und anti-korreliert mit CD172a und CD11b	34
3.1.3	Der Phänotyp der XCR1 ⁺ dendritischen Zellen ist relativ homogen unabhängig von ihrer CD8-Expression	35
3.2	Die Entwicklung XCR1-positiver dendritischer Zellen der Milz	37
3.2.1	Die XCR1-Expression dendritischer Zellen verändert sich einschneidend während der Ontogenese	38
3.2.2	Der Wachstumsfaktors Flt3 Ligand vermehrt selektiv XCR1-positive dendritische Zellen	41
3.2.3	Die Entwicklung XCR1-positiver dendritischer Zellen ist abhängig von den Transkriptionsfaktoren Batf3 und IRF-8	42
3.3	Untersuchung der Funktion XCR1-positiver dendritischer Zellen der Milz	43
3.3.1	XCR1-positive dendritische Zellen nehmen effizient zellassoziertes Antigen auf.....	43
3.3.2	Die Antigenpräsentation durch dendritische Zellsubtypen	44
3.3.2.1	Sortierung der XCR1 ⁺ CD8 ⁺ , XCR1 ⁺ CD8 ⁻ , XCR1 ⁻ CD8 ⁺ und XCR1 ⁻ CD8 ⁻ dendritischen Zellsubtypen	44
3.3.2.2	Die Peptidpräsentation durch XCR1 ⁺ CD8 ⁺ , XCR1 ⁺ CD8 ⁻ , XCR1 ⁻ CD8 ⁺ und XCR1 ⁻ CD8 ⁻ dendritische Zellen an CD4 ⁺ sowie CD8 ⁺ T-Zellen ist vergleichbar stark ausgeprägt.....	46

3.3.2.3	XCR1-positive dendritische Zellen kreuzpräsentieren effektiv lösliches und zellassoziertes Antigen	47
3.4	Bestimmung der XCR1-Expression des murinen Thymus, der Haut-dränierenden Lymphknoten sowie der Haut	48
3.4.1	CD8-positive dendritische Zellen des Thymus exprimieren XCR1	48
3.4.2	Die Expression von XCR1 korreliert mit CD103 auf migratorischen DC und mit CD8 sowie CD205 auf residenten DC Haut-dränierender Lymphknoten	49
3.4.3	Bestimmung der XCR1-Expression der Haut	51
3.4.4	Die Entwicklung XCR1-positiver dendritischer Zellen lymphatischer Organe ist stark abhängig von den Transkriptionsfaktoren Batf3 und IRF-8	52
3.5	Charakterisierung humaner dendritischer Zellen des peripheren Blutes	55
3.5.1	Etablierung einer spezifischen Sortierungsstrategie für humane dendritische Zellsubtypen.....	55
3.5.2	CD141-positive dendritische Zellen exprimieren spezifisch mRNA des Chemokinrezeptors XCR1.....	57
3.5.3	CD141-positive dendritische Zellen exprimieren XCR1 auf der Zelloberfläche ..	59
3.5.4	Die Peptidpräsentation an CD8 ⁺ T-Zellen ist bei allen humanen dendritischen Zellsubtypen vergleichbar	60
3.5.5	CD141-positive dendritische Zellen kreuzpräsentieren effektiv lösliches und zelluläres Antigen.....	61
4	Diskussion.....	64
	Referenzen	73
	Danksagung	85
	Publikationen	87
	Eidesstattliche Erklärung.....	89

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Klassifizierung dendritischer Zellen der Haut-dränierenden Lymphknoten	8
Abb. 2	Klassifizierung dendritischer Zellen des humanen peripheren Blutes.....	10
Abb. 3	Kreuzpräsentation von Antigenen	12
Abb. 4	Eingrenzung der Zellen bei durchflusszytometrischen Messungen	28
Abb. 5	CD8 ⁺ und DN konventionelle dendritische Zellen der Milz exprimieren den Chemokinrezeptor XCR1	33
Abb. 6	T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen und Makrophagen der Milz exprimieren kein XCR1	34
Abb. 7	Die Expression von XCR1 auf dendritischen Zellen der Milz korreliert mit CD8, CD205 sowie Clec9A und anti-korreliert mit CD172a und CD11b	35
Abb. 8	Der Phänotyp XCR1 ⁺ CD8 ⁺ und XCR1 ⁺ CD8 ⁻ dendritischer Zellen ist vergleichsweise analog und abweichend von XCR1 ⁻ dendritischen Zellen.....	37
Abb. 9	Die Frequenz, Anzahl und der Phänotyp XCR1-positiver dendritischer Zellen der Milz während der Ontogenese	40
Abb. 10	XCR1-positive dendritische Zellen der Milz sind stark vermehrt nach Behandlung mit Flt3 Ligand	41
Abb. 11	In <i>Batf3</i> - und <i>Irf-8</i> -defizienten Mäusen sind keine XCR1-positiven dendritischen Zellen in der Milz detektierbar	43
Abb. 12	XCR1-positive dendritische Zellen nehmen effizient zellassoziertes Antigen auf ..	44
Abb. 13	Sortierungsstrategie der XCR1 ⁺ CD8 ⁺ , XCR1 ⁺ CD8 ⁻ , XCR1 ⁻ CD8 ⁺ und XCR1 ⁻ CD8 ⁻ dendritischen Zellsubtypen der Milz	45
Abb. 14	Die Peptidpräsentation durch XCR1 ⁺ CD8 ⁺ , XCR1 ⁺ CD8 ⁻ , XCR1 ⁻ CD8 ⁺ und XCR1 ⁻ CD8 ⁻ dendritischen Zellen an CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen ist vergleichbar...	46
Abb. 15	XCR1-positive dendritische Zellen kreuzpräsentieren sowohl lösliches als auch zellassoziertes Antigen stärker als XCR1-negative Zellen.....	48
Abb. 16	XCR1 wird spezifisch auf einem Teil der CD8-positiven dendritischen Zellen des Thymus exprimiert	49
Abb. 17	Ein Teil der residenten und migratorischen dendritischen Zellen Haut-dränierender Lymphknoten exprimieren XCR1	50
Abb. 18	XCR1 korreliert mit CD103 auf migratorischen DC und CD8 sowie CD205 auf residenten DC der Haut-dränierenden Lymphknoten	51
Abb. 19	XCR1 kann auf Zellen der Haut nicht in der Durchflusszytometrie detektiert werden.....	52

Abb. 20	Die Entwicklung XCR1-positiver dendritischer Zellen lymphatischer Organe ist abhängig von den Transkriptionsfaktoren Batf3 und IRF-8	54
Abb. 21	Sortierungsstrategie humaner dendritischer Zellsubtypen.....	56
Abb. 22	Der Anteil und die Anzahl dendritischer Zellsubtypen im peripheren Blut des Menschen	57
Abb. 23	CD141-positive dendritische Zellen des peripheren Blutes exprimieren XCR1-mRNA.....	59
Abb. 24	Der Rezeptor XCR1 ist ausschließlich auf CD141-positiven dendritischen Zellen des peripheren Blutes exprimiert	60
Abb. 25	Die Peptidpräsentation der DC-Subtypen des peripheren Blutes ist vergleichbar	61
Abb. 26	CD141-positive dendritische Zellen stimulieren CD8 ⁺ T Zellen effektiv durch Kreuzpräsentation von löslichem und zellassoziertem Antigen	63

Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Phänotyp residenter dendritischer Zellsubtypen der Milz	7
Tab. 2	Mausstämme	15
Tab. 3	Anti-murine monoklonale Antikörper	18
Tab. 4	Anti-humane monoklonale Antikörper	19
Tab. 5	Primer-Sonde Sets zur quantitativen Bestimmung der murinen XCR1-Expression	20
Tab. 6	Primer-Sonde Sets zur quantitativen Bestimmung der humanen XCR1- Expression.....	20
Tab. 7	Isolierungsstrategien von Zellpopulationen aus dem humanen peripheren Blut .	25
Tab. 8	Fluorophore und ihre Absorptions-/Emissionsmaxima	27

Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
ACK	<i>ammonium chloride-potassium erythrocyte lysing buffer</i>
APC	<i>antigen-presenting cell</i> , antigenpräsentierende Zelle(n)
ATAC	<i>activation-induced, T cell derived and chemokine-related molecule</i> ; auch XCL1 genannt
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
Batf3	<i>basic leucine zipper transcription factor, ATF-like 3</i>
BfR	Bundinstitut für Risikobewertung
BP	Bandpass
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , Rinderserumalbumin
β2ME	β-2-Mikroglobulin
CD	<i>cluster of differentiation</i> , Unterscheidungsgruppe
CD205	DEC-205
CD206	Mannose-Rezeptor
CD207	Langerin
cDC	<i>conventional dendritic cell(s)</i> , konventionelle dendritische Zelle(n)
cDNA	<i>complementary</i> Deoxyribonukleinsäure, komplementäre Deoxyribonukleinsäure
CFSE	<i>5- and 6-Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester</i>
Clec9A	<i>C-type lectin domain family 9A</i>
CMV	<i>Cytomegalovirus</i> , Zytomegalievirus
d	<i>day(s)</i> , Tag(e)
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
DC	<i>Dendritic Cell</i> , dendritische Zellen(n)
DGZ	Dichtegradientenzentrifugation
DIG	Digoxigenin
DN DC	CD4 ⁻ CD8 ⁻ (doppelt negative) dendritische Zelle(n)
E	Exon
ECACC	<i>European Collection of Cell Cultures</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	<i>enhanced</i> grün fluoreszierendes Protein
ELISA	Enzymgekoppelter Immunabsorptions Assay
EU	<i>endotoxin unit</i> , Endotoxineinheit
V	Vorwärtsprimer

Abkürzungsverzeichnis

FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i> , fluoreszenzaktivierte Zellsortierung
FAM	6-Carboxy-Fluorescein
FCS	<i>fetal calf serum</i> , fötales Kälberserum
FDG	Fluorescein di- β -D-galactopyranosid
Flt3	<i>FMS-related tyrosine kinase 3</i>
FMG	Fluorescein Monogalactosid
FSC	<i>forward scatter</i> , Vorwärts-scatter
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage-colony stimulating factor</i>
GPCR	<i>G-protein coupled receptor(s)</i> , G-Protein gekoppelte(r) Rezeptor(en)
Gy	Gray
HCMV	<i>human Cytomegalovirus</i> , humanes Zytomegalievirus
HLA	<i>human leucocyte antigen</i> , humanes Leukozytenantigen
ho	hoch
ICSBP	<i>interferon consensus binding protein</i>
Ig	Immunglobulin
IFN	Interferon
i.v.	intravenös
IL	Interleukin
KO	<i>knock out</i>
Lin	linienspezifisch
LN	<i>lymph node</i> , Lymphknoten
MACS	<i>magnetic activated cell sorting</i> , magnetisch-aktivierte Zellsortierung
mAk	monoklonale(r) Antikörper
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> , Haupthistokompatibilitätskomplex
mi	mittel
MLR	<i>mixed lymphocyte reaction</i>
MoDC	<i>monocyte-derived dendritic cells</i> , aus Monozyten-generierte dendritische Zelle(n)
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> , Boten-Ribonukleinsäure
Nect2	<i>nectin-like protein 2</i>
NFIL3	<i>nuclear factor, IL-3 regulated</i>
NK	<i>natural killer cell</i> , natürliche Killerzelle
NKT	<i>natural killer T cells</i> , natürliche Killer T-Zelle
ns	nicht signifikant
OVA	Ovalbumin

PacB	<i>Pacific Blue</i>
PacO	<i>Pacific Orange</i>
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cell</i> , mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphatgepufferte Salzlösung
pDC	<i>plasmacytoid dendritic cell(s)</i> , plasmazytoide dendritische Zelle(n)
PE	Phycoerythrin
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionenkonzentration
pp65	<i>lower matrix phpsphoprotein</i>
qRT-PCR	<i>quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction</i> ,
R	Rückwärtsprimer
S	Sonde
SPF	spezifisch-pathogenfreie Zucht
SSC	<i>sidescatter</i> , Seitwärts-scatter
StdAbw	Standardabweichung
s.k.	subkutan
Tab	Tabelle
TAMRA	6-Carboxy-tetramethylrhodamin
TF	Transkriptionsfaktor(en)
U	<i>unit</i>

Zusammenfassung

Bei der Kreuzpräsentation durch dendritische Zellen (DC) werden extrazelluläre Antigene in den MHC I-Präsentationsweg eingeschleust und CD8⁺ T-Zellen präsentiert. Bisher werden die kreuzpräsentierenden DC der Maus durch die Expression des Korezeptors CD8 in der Milz und des Integrins CD103 in der Peripherie definiert. Der kreuzpräsentierende Subtyp primärer humaner DC war vor Beginn dieser Arbeit nicht bekannt. Der Chemokinrezeptor XCR1 spielt eine wichtige Rolle in der Interaktion zwischen DC und CD8⁺ T-Zellen während der Kreuzpräsentation, wobei weder eine Abgrenzung der XCR1⁺ Zellen möglich war noch der entsprechende Zelltyp im humanen System identifiziert wurde.

Innerhalb dieser Arbeit konnte erstmals eine durchflusszytometrische Färbung von XCR1 auf der Oberfläche von Zellen etabliert werden, wodurch demonstriert wurde, dass XCR1 auf 83 % der CD8⁺ und 4 % der CD8⁻CD4⁻ DC der Milz exprimiert wird. Auch im Thymus und den Haut-dränierenden Lymphknoten (LN) konnten XCR1⁺ DC nachgewiesen werden. Der Phänotyp der XCR1⁺ DC der Milz unterschied sich deutlich von dem der XCR1⁻ DC in der Expression der Rezeptoren CD86, CD103, CD172a, CD205, CD207 und Clec9A. Um die Abhängigkeit der Entwicklung von XCR1⁺ DC von bestimmten Transkriptionsfaktoren sowie dem Wachstumsfaktor Flt3 Ligand zu untersuchen, wurden *Batf3*- und *Irf-8*-defiziente Mäuse analysiert und C57BL/6 Mäusen Flt3 Ligand appliziert. In beiden *knock out* Mausstämmen konnten keine XCR1⁺ DC in der Milz detektiert werden und die XCR1⁺ DC des Thymus und der haut-dränierenden LN waren deutlich reduziert. Zudem wurde nach Applikation von Flt3 Ligand der Anteil der XCR1⁺ DC signifikant erhöht. Bei der Untersuchung der Antigenkreuzpräsentation wurden alle Subtypen konventioneller DC anhand ihrer CD8- und XCR1-Expression sortiert, wobei die XCR1⁺ DC am effizientesten lösliches und zellassoziertes Antigen an CD8⁺ T-Zellen präsentieren konnten. Damit kann XCR1 als Oberflächenmarker verwendet werden, um murine kreuzpräsentierende DC zu kennzeichnen. Diese DC Population ist zudem stark abhängig von Batf3, IRF-8 und Flt3 Ligand.

Um herauszufinden, ob XCR1⁺ DC auch im Menschen existieren, wurde die Expression von XCR1 auf Zellen des humanen peripheren Blutes anhand von qPCR und Durchflusszytometrie untersucht. Ausschließlich CD141⁺ DC exprimierten XCR1-mRNA und -Protein. Für die Untersuchung der Kreuzpräsentation durch humane DC wurde eine effektive Sortierungsstrategie zur Isolierung aller DC-Subtypen etabliert. Dadurch konnte erstmals gezeigt werden, dass die CD141⁺ DC den einzigen effektiven kreuzpräsentierenden DC-Subtyp des Blutes darstellen. XCR1 ist somit auch im humanen System spezifisch auf kreuzpräsentierenden DC exprimiert. Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass es sich bei den XCR1⁺ DC der Maus und des Menschen um funktionelle Homologe handelt.

Schlagwörter: Dendritische Zellen, Kreuzpräsentation, Chemokinrezeptor XCR1, Populationsmarker

Abstract

Cross-presentation by dendritic cells (DC) is a process, in which extracellular antigen is shunted into the MHC I presentation pathway and presented to CD8⁺ T cells. So far, murine cross-presenting DC were defined by the expression of the co-receptor CD8 in the spleen and the integrin CD103 in the periphery. However, cross-presenting DC have not been characterized in humans. The chemokine receptor XCR1 has previously been shown to have a pivotal role in the interaction of murine DC and CD8⁺ T cells during cross-presentation but a delineation of the XCR1⁺ cells has not been established and the corresponding cell type in humans has not been identified.

In this work, a flow cytometric staining of XCR1 was established for the first time which allowed the detection of XCR1 on 83 % of CD8⁺ DC and 4 % of CD8⁻CD4⁻ DC of the spleen. Also, in the thymus and skin-draining lymph nodes (LN), XCR1⁺ DC were detected. The phenotype of splenic XCR1⁺ DC differed markedly from XCR1⁻ DC in the expression of the proteins CD86, CD103, CD172a, CD205, CD207 and Clec9A. To analyze the developmental dependence of XCR1⁺ DC on certain transcription factors and the growth factor Flt3 ligand, *Batf3*- and *Irf-8*-deficient mice were analysed and C57BL/6 mice were treated with Flt3 ligand. Both knock out mouse strains showed an absence of splenic XCR1⁺ DC and a strong reduction of XCR1⁺ DC in thymus and skin-draining LN. Furthermore, the frequency of XCR1⁺ DC was significantly increased in the spleen of mice treated with Flt3 ligand. To test the ability to cross-present antigen, all splenic conventional DC were sorted according to their expression of CD8 and XCR1. XCR1⁺ DC were most efficient in cross-presenting soluble and cell-associated antigen to CD8⁺ T cells. Therefore, XCR1 is the first surface marker that can be used to delineate murine cross-presenting DC and the development of this distinct DC population is strongly dependent on *Batf3*, *IRF-8* and Flt3 ligand.

To explore if XCR1⁺ DC also exist in men, cell populations of human peripheral blood were analysed for their XCR1-expression using qPCR and flow cytometric staining. Only CD141⁺ DC express XCR1 mRNA and protein. An efficient sorting strategy for the isolation of all DC subsets was established to compare their ability to cross-present soluble and cell-associated antigen. CD141⁺ DC were the only effective cross-presenting DC subtype. Therefore, XCR1 is also in the human a receptor expressed specifically on cross-presenting DC. In summary, the data show that the XCR1⁺ DC of mouse and men are functional homologues.

Keywords: Dendritic cells, cross-presentation, chemokine receptor XCR1, lineage marker

1 Einleitung

1.1 Dendritische Zellen

Ralph Steinman entdeckte 1973 einen sternenförmigen Zelltyp in peripheren lymphoiden Organen der Maus, den er „dendritische Zelle“ (DC) nannte (Steinman und Cohn, 1973). In den folgenden Jahrzehnten löste die Entdeckung der DC zwei immunologische Fragestellungen: Erstens wurden damit die Zellen identifiziert, die zur Initiierung der T-Zell-abhängigen Immunantwort führen. Zweitens wurde der Zelltyp beschrieben, der Fragmente von Molekülen (Antigene) aus der Peripherie in die Lymphknoten transportiert und dort präsentiert. Dadurch wurde erstmals die zelluläre Verbindung zwischen peripheren Geweben, die Pathogenen ausgesetzt sind, und lymphatischen Organen, in denen eine Immunantwort gegen diese Pathogene ausgelöst wird, beschrieben (Villadangos und Young, 2008).

Neben DC gehören Makrophagen und B-Zellen zu den professionellen antigenpräsentierenden Zellen (APC) des adaptiven Immunsystems. Diese drei Zelltypen zeichnet aus, dass sie neben den Haupthistokompatibilitätskomplexen (MHC) der Klasse I, die von allen kernhaltigen Zellen des Körpers exprimiert werden, auch MHC II auf ihrer Oberfläche tragen. Sie können besonders effizient Antigene aus der Umgebung aufnehmen und innerhalb der Zelle prozessieren. Peptide dieser prozessierten Antigene können über MHC I den zytotoxischen $CD8^+$ T-Zellen sowie über MHC II den $CD4^+$ T-Helferzellen präsentiert werden. Diese Arbeit konzentriert sich auf DC, die im Gegensatz zu den anderen APC zusätzliche Kriterien zur T-Zell-Aktivierung erfüllen (Thaiss *et al.*, 2011): (i) Naive DC sind an allen Schleimhautoberflächen, in der Haut und in lymphatischen Organen strategisch positioniert. (ii) Sie besitzen eine hohe endozytotische Kapazität und nehmen ständig Antigene aus ihrer Umgebung auf. Ihre vielfältigen Mechanismen zur Aufnahme beinhalten u.a. die unspezifische Phagozytose und Pinozytose. Weiterhin können sie durch rezeptorvermittelte Endozytose, wie z.B. durch den Mannose-Rezeptor (CD206) oder DEC-205 (CD205), spezifische Antigene von Pathogenen aufnehmen. (iii) Nach Aktivierung migrieren DC, geleitet durch Chemokine, in die T-Zellzonen der dränierenden Lymphknoten bzw. der Milz. Während der Migration prozessieren sie die aufgenommenen Antigene und reifen heran. Dazu gehört, dass sie große Mengen an peptidbeladenen MHC-Komplexen sowie die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 heraufregulieren. Beides ist notwendig, um eine Erkennung der prozessierten Antigene durch spezifische T-Zellen und

deren Aktivierung zu ermöglichen. Während der Interaktion der Peptid:MHC-Komplexe mit dem T-Zellrezeptor, sorgen die kostimulatorischen Moleküle für ein notwendiges zweites Signal, indem sie an CD28-Moleküle auf der T-Zelloberfläche binden. Reife DC sind dadurch in der Lage naive CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen mit großer Effizienz zu stimulieren. Durch diese komplexen Prozesse können DC die adaptive Immunantwort einleiten.

Liegt kein Entzündungsreiz vor, präsentieren DC kontinuierlich eigene Antigene oder Trümmer sterbender Zellen. Hierdurch wird eine Toleranz gegenüber körpereigenen Antigenen aufrechterhalten. Um „fremd“ von „eigen“ zu unterscheiden, exprimieren DC eine Vielzahl an *pattern-recognition receptors*, z.B. Toll-ähnliche Rezeptoren (TLR). Durch diese können DC Pathogene anhand von charakteristischen Pathogen-assoziierten molekularen Mustern, wie z.B. Lipopolysaccharid (LPS) gramnegativer Bakterien, erkennen.

Die Bedeutung der DC wird vor allem deutlich, wenn diese *in vivo* fehlen. Werden DC künstlich depletiert, kommt keine normale Immunantwort zustande (Jung *et al.*, 2002; Neuenhahn *et al.*, 2006). Die Tiere können nach der Depletion der DC beispielsweise keine zytotoxische CD8⁺ T-Zellantwort gegen Bakterien wie *Listeria* oder den Malaria Parasiten *Plasmodium* auslösen.

1.1.1 Murine dendritische Zellsubtypen

DC repräsentieren keine homogene Zellpopulation, sondern können anhand ihres Phänotyps, der Lokalisierung im Gewebe und ihrer Funktion in Subtypen unterteilt werden (Vremec *et al.*, 2000; Shortman und Liu, 2002; Villadangos und Heath, 2005; Steinman, 2010). Sie werden in konventionelle (cDC) und plasmazytoide DC (pDC) gegliedert. Plasmazytoide DC produzieren während viraler Infektionen große Mengen an Typ I Interferonen (IFN). Sie lassen sich anhand ihrer geringen Expression von MHC II und CD11c, sowie der starken Expression von CD45RA, B220 und dem spezifischen Rezeptor CD317 (PDCA-1) charakterisieren (O’Keeffe *et al.*, 2002; Blasius *et al.*, 2006). Weiterhin exprimieren sie keine Populationsmarker (Lin) für T-Zellen (CD3), B-Zellen (CD19), NK-Zellen (NK1.1), Monozyten (CD14) und Granulozyten (Ly6G/C).

Der prozentuale Anteil der cDC an aufgereinigten Lymphozyten der Milz beträgt ca. 1 %. Im Kontrast zu pDC zeigen sie eine starke CD11c- sowie MHC II-Expression. In der Milz sind ausschließlich residente DC vorhanden. Deren Name leitet sich davon ab, dass ihre Vorläufer aus dem Knochenmark direkt in lymphatische Gewebe einwandern und dort das Blut bzw. die Lymphe auf Antigene filtern. Residente DC lymphatischer Organe können anhand ihrer

Expression der Oberflächenrezeptoren CD4 und CD8 in drei Subtypen unterteilt werden: (1) $CD8^+CD4^-$ DC („ $CD8^+$ DC“), (2) $CD4^+CD8^-$ DC („ $CD4^+$ DC“) und (3) $CD8^-CD4^-$ DC (doppelt-negative „DN“) DC (Vremec *et al.*, 2000). Die letzten beiden Subtypen werden auch oft als $CD8^-$ DC zusammengefasst. Neben diesen zwei Korezeptoren wurden weitere Moleküle zur Unterteilung der DC-Subtypen eingeführt, wie z.B. CD103, CD205 oder CD207 (Tab. 1).

Tab. 1 Phänotyp residenter dendritischer Zellsotypen der Milz

DC-Subtyp	Phänotyp									
	CD11c	CD4	CD8	CD103	CD205	CD207	Clec9A	CD11b	CD172a	CD45RA
$CD8^+$ DC	++	-	++	+	+	+	+	-	-	-
$CD4^+$ DC	++	+	-	-	-	-	-	++	+	-
DN DC	++	-	-	-	-	-	-	++	+	-
pDC	+	±	±	-	-	-	+	-	-	++

DC: Dendritische Zelle(n); DN: doppelt negativ für CD8 und CD4; pDC: plasmazytoide DC. Die ++ versus + Darstellung repräsentiert starke versus schwache Expression; - keine Expression; ± kann unter besonderen Bedingungen exprimiert werden (Tabelle verändert nach Segura und Villadangos, 2009; Shortman und Heath, 2010).

In den Lymphknoten (LN) findet man neben den drei residenten DC-Subtypen zwei migratorische DC-Subtypen. Im Kontrast zu residenten DC wandern diese vom Knochenmark in periphere Organe, in denen sie Antigene aufnehmen und zu den dränierenden LN transportieren. Residente und migratorische DC der Haut-dränierenden LN kann man anhand ihrer CCR7-Expression unterscheiden (Ohl *et al.*, 2004) (Abb. 1). Dieser Chemokinrezeptor wird neben B- und T-Zellen auch von DC hochreguliert, wenn sie zu den Chemokinen CCL19 und CCL21 in die T-Zellzonen einwandern. Weiterhin zeigen $CCR7^+$ DC im Ruhezustand eine stärkere MHC II-Expression als $CCR7^-$ DC (Ohl *et al.*, 2004). Unterteilt werden die migratorischen DC meist anhand ihrer CD103-Expression in $CD103^+$ und $CD103^-$ DC (Bedoui *et al.*, 2009b; Shortman und Heath, 2010; Hashimoto *et al.*, 2011). Residente DC der Haut-dränierenden LN können nach ihrer CD8-Expression unterteilt werden.

Im Thymus werden residente und migratorische DC bei der Analyse nicht getrennt voneinander betrachtet, sondern in $CD8^+CD172a^-$ und $CD8^-CD172a^+$ DC gegliedert (Wu und Shortman, 2005; Lahoud *et al.*, 2006).

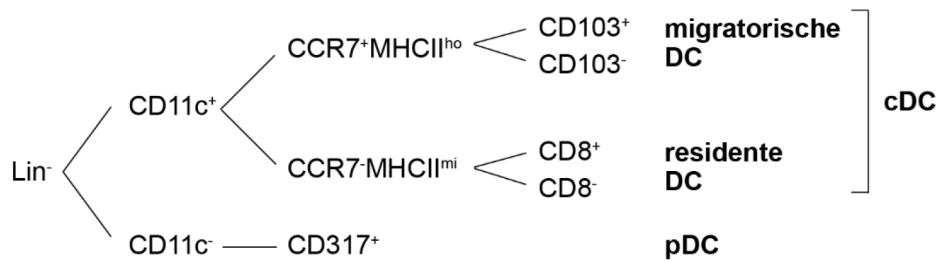


Abb. 1 Klassifizierung dendritischer Zellen der Haut-dränierenden Lymphknoten

Dendritische Zellen (DC) Haut-dränierender Lymphknoten sind negativ für die Populationsmarker (Lin) CD3 und CD19. Nach ihrer CD11c-Expression werden sie in konventionelle DC (cDC) und plasmazytoide DC (pDC) unterteilt. cDC können anhand ihrer CCR7- und MHC II-Expression in migratorische (CCR7⁺MHCII^{hoch}) und residente DC (CCR7⁻MHCII^{mittel}) gegliedert werden, die jeweils nach ihrer CD103- oder CD8-Expression in zwei Subtypen unterteilt werden. pDC tragen den spezifischen Rezeptor CD317 (graphisch dargestellt anhand der Daten von Ohl *et al.*, 2004; Bedoui *et al.*, 2009b; Bar-On und Jung, 2010).

1.1.1.1 Besondere Eigenschaften der CD8-positiven dendritischen Zellen der Milz

Sowohl durch ihren Phänotyp, ihre Ontogenese als auch durch ihre Funktion lassen sich die CD8⁺ DC von den anderen DC-Subtypen unterscheiden. Die Expression von CD8 grenzt 15-20 % der DC der Milz von den CD4⁺ und DN DC ab. Zur Definition dieses DC-Subtypes wird neben CD8 die Expression von CD103, CD205, CD207 und Clec9A verwendet (siehe Tab. 1). Da die Moleküle CD205 und Clec9A hauptsächlich auf CD8⁺ DC exprimiert sind und zudem nicht auf T-Zellen vorkommen, können sie zum spezifischen Beladen dieser Zellen verwendet werden (Dudziak *et al.*, 2007; Caminschi *et al.*, 2008; Sancho *et al.*, 2008). CD8⁺ DC exprimieren kein oder nur geringe Mengen an CD4, CD11b, CD172a (SIRPα) und CD45R.

Der ontogenetische Ursprung der CD8⁺ DC wurde in den letzten Jahren detailliert aufgeklärt (Liu und Nussenzweig, 2010). Der Wachstumsfaktor *FMS-related tyrosine kinase 3 ligand* (Flt3 Ligand) ist zur Entwicklung der CD8⁺ DC notwendig. Daher sind in Flt3 Ligand *knock out* (KO) Mäusen die CD8⁺ DC um das 11-fache reduziert (McKenna *et al.*, 2000). Nach Gabe von Flt3 Ligand *in vivo* steigt die Frequenz der CD8⁺ DC um das 10-fache an (Maraskovsky *et al.*, 1996). Die Entwicklung der CD8⁺ DC ist weiterhin von folgenden Transkriptionsfaktoren (TF) abhängig: *interferon consensus binding protein* (ICSBP/IRF-8), *basic leucine zipper transcription factor*, *ATF-like 3* (Batf3), *DNA-binding protein inhibitor* (Id2) sowie dem *nuclear factor*, *IL-3 regulated* (NFIL3/E4BP4). Ist eines dieser Moleküle nicht vorhanden, entwickeln sich *in vivo* keine bzw. nur wenige CD8⁺ DC (Hacker *et al.*, 2003; Aliberti *et al.*, 2003; Tsujimura *et al.*, 2003; Hildner *et al.*, 2008; Kashiwada *et al.*,

2011). Während Batf3 hauptsächlich die Entwicklung der CD8⁺ DC beeinflusst, werden bei Depletion der anderen TF weitere Zellpopulationen bzw. ganze Organe verändert.

Nach Aktivierung sekretieren CD8⁺ DC ein für sie spezifisches Zytokinmuster, wobei insbesondere die Produktion großer Mengen IL-12p70 charakteristisch für diesen Zelltyp ist (Hochrein *et al.*, 2001). Durch die Ausschüttung dieses Zytokins wird die Entwicklung von CD4⁺ T-Zellen zu Th1 Helferzellen angeregt (Maldonado-Lopez *et al.*, 1999; Pulendran *et al.*, 1999). Die Aufnahme von löslichem Antigen ist bei allen DC-Subtypen stark ausgeprägt; CD8⁺ DC heben sich durch eine effiziente Phagozytose toter Zellen von den anderen DC-Subtypen ab (Schulz *et al.*, 2002; Iyoda *et al.*, 2002; Schnorrer *et al.*, 2006). Dies liegt zum Teil an der Expression bestimmter Rezeptoren, wie z.B. CD205, CD206 und Clec9A, die an der Aufnahme von Antigenen beteiligt sind. Eines der markantesten Merkmale der CD8⁺ DC ist die effektive Kreuzpräsentation von Antigenen (zur Erläuterung der Kreuzpräsentation siehe Kap 1.2; den Haan *et al.*, 2000; Pooley *et al.*, 2001).

Einige kürzlich erschienenen Publikationen legen nahe, dass die CD8⁺ DC keine homogene Population darstellen (Lin *et al.*, 2008; Farrand *et al.*, 2009; Qui *et al.*, 2009; Bar-On *et al.*, 2010). Dies beruht auf folgenden Beobachtungen: Bei Applikation von Cytochrom C *in vivo* sterben nicht alle CD8⁺ DC. Cytochrom C kann nur von kreuzpräsentierenden Zellen nach der Aufnahme in das Zytosol überführt werden, wo es in Kombination mit anderen Proteinen das Apoptosom bildet und zum Zelltod führt (Lin *et al.*, 2008). Weiterhin kann nur ein Teil der CD8⁺ DC effizient zellassoziierte Antigene aufnehmen und kreuzpräsentieren (Farrand *et al.*, 2009; Qui *et al.*, 2009).

1.1.2 Dendritische Zellen des humanen peripheren Blutes

Dendritische Zellen des humanen peripheren Blutes exprimieren, neben dem humanen Leukozytenantigen DR (HLA-DR, eines der humanen MHC II Moleküle), keine populationsspezifischen Marker für T-Zellen (CD3), B-Zellen (CD19/CD20), NK-Zellen (CD56), Monozyten (CD14) und Granulozyten (CD15). Sie umfassen nur etwa 1 % der mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) und können unterteilt werden in CD11c⁻CD304⁺ (BDCA-4) pDC und CD11c⁺ cDC (Grouard *et al.*, 1997; Robinson *et al.*, 1999; Kohrgruber *et al.*, 1999; Dzionek *et al.*, 2000). Eine akzeptierte Unterteilung der cDC wurde im Jahr 2000 von Dzionek *et al.* eingeführt: basierend auf der Expression von CD1c (BDCA-1), CD16 und CD141 (BDCA-3) werden sie in drei Subtypen unterteilt (Abb. 2). Auch ein CD34⁺ cDC-Subtyp ist beschrieben (MacDonald *et al.*, 2002); aufgrund der

fehlenden Expression von CD11c und CD86 wird jedoch angenommen, dass diese Zellen Vorläuferzellen der DC darstellen (Piccioli *et al.*, 2007).

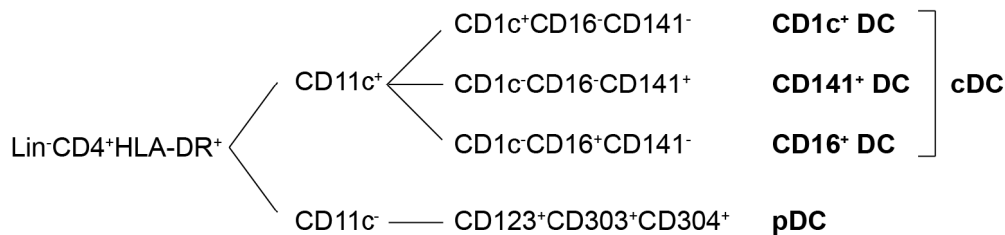


Abb. 2 Klassifizierung dendritischer Zellen des humanen peripheren Blutes

Humane dendritische Zellen (DC) des peripheren Blutes sind negativ für die Populationsmarker (Lin) CD3, CD14, CD15, CD19/CD20 und CD56. Sie exprimieren CD4 und HLA-DR und lassen sich in konventionelle CD11c⁺ DC (cDC) und plasmazytoide CD11c⁻ DC (pDC) unterteilen. Die cDC lassen sich anhand der Marker CD1c, CD16 und CD141 in drei Subtypen gliedern. Die Rezeptoren zur Klassifizierung von CD11c⁺ cDC sind nicht auf CD11c⁻ pDC exprimiert und umgekehrt. (verändert nach Wang *et al.*, 2009).

Alle DC-Subtypen des Menschen tragen (im Gegensatz zur Maus) CD4 auf der Oberfläche, exprimieren aber kein CD8 (O'Doherty *et al.*, 1993). Daher ist eine direkte Übertragung des Phänotyps von der Maus auf den Menschen nicht möglich. Es gibt jedoch erste Hinweise, dass CD141⁺ DC des humanen peripheren Blutes das Homolog der CD8⁺ DC der Maus sein könnten. Diese Hypothese wurde aufgestellt, weil u.a. das Molekül *Nectin-like protein 2* (Nec12) sowohl auf CD141⁺ DC des Menschen, als auch auf CD8⁺ DC der Maus exprimiert wird (Galibert *et al.*, 2005). Auch die Expression von Clec9A ist für CD141⁺ und CD8⁺ DC beschrieben (Caminschi *et al.*, 2008; Huysamen *et al.*, 2008; Sancho *et al.*, 2008). Verstärkt wurde die Hypothese durch den Vergleich des Transkriptoms der DC-Subtypen von Mensch und Maus durch Robbins *et al.* (2008), wobei sich herausstellte, dass sich die Genexpression der hypothetischen Korrelate stark ähnelte.

Eine funktionelle Unterteilung der DC ist bisher im humanen System kaum möglich, da entsprechende Ergebnisse nicht für alle DC-Subtypen vorliegen. Die meisten publizierten Daten basieren auf Experimenten mit DC, die entweder aus Monozyten (MoDC) oder CD34⁺ hämatopoetischen Vorläuferzellen generiert wurden (Caux *et al.*, 1992; Reid *et al.*, 1992; Romani *et al.*, 1994; Sallusto und Lanzavecchia, 1994). Inwieweit diese Zellen den einzelnen primären DC entsprechen, ist aber unbekannt. Weiterhin wurde die Effektivität der Aufnahme von Antigenen einzelner DC-Subtypen widersprüchlich beschrieben. Einerseits wurde gezeigt, dass cDC wesentlich effektiver Zymosanpartikel, Dextran und Rinderserumalbumin (BSA) aufnehmen können als pDC (Robinson *et al.*, 1999). Andererseits zeigten Dzionek *et*

al. (2000), dass neben $CD1c^+$ und $CD141^+$ DC auch pDC *Lucifer Yellow* oder FITC-Dextran aufnehmen können. Die Fähigkeit, allogene T-Zellen zu stimulieren (*mixed lymphocyte reaction*, MLR), ist bei cDC eindeutig stärker ausgeprägt als bei pDC (Robinson *et al.*, 1999; Kohrgruber *et al.*, 1999). Diese Eigenschaft wurde auch für cDC-Subtypen untersucht und es konnte gezeigt werden, dass $CD1c^+$ stärkere Stimulatoren von allo-genen T-Zellen sind als $CD16^+$ und $CD141^+$ DC. Die Kreuzpräsentation der einzelnen primären DC-Subtypen wurde noch nicht vergleichend untersucht (siehe Kap. 1.2).

1.2 Die Kreuzpräsentation von Antigenen

Die Fähigkeit, exogene Antigene aufzunehmen und über MHC II zu präsentieren sowie endogene Antigene über MHC I zu präsentieren, haben murine $CD8^+$ DC mit den anderen DC-Subtypen gemein. Im Unterschied zu $CD8^-$ DC zeichnet sie die wirksame Kreuzpräsentation von löslichem und zellgebundenem Antigen aus (den Haan *et al.*, 2000; Pooley *et al.*, 2001). Bei dieser Art der Antigenpräsentation werden Eigenschaften der beiden klassischen Präsentationswege vereinigt, d.h. exogene Antigene werden in den MHC Klasse I-Weg überführt und $CD8^+$ T-Zellen präsentiert (Abb. 3; Bevan *et al.*, 1976a; 1976b). Die Kreuzpräsentation befähigt DC u.a. dazu, Gewebs-Antigene zur Induktion der Toleranz im Ruhezustand zu präsentieren. Im Falle einer Infektion werden bakterielle und virale Antigene sowie Bruchstücke infizierter Zellen kreuzpräsentiert (Heath *et al.*, 2004; Wilson *et al.*, 2006; Villadangos und Schnorrer, 2007.). So können z.B. infizierte Zellen, die nicht zum Immunsystem gehören, von DC aufgenommen und kreuzpräsentiert werden und dadurch eine Immunantwort ausgelöst werden.

Neben den $CD8^+$ DC der Milz sind auch die migratorischen $CD103^+$ DC der Peripherie effizient in der Kreuzpräsentation von Antigenen (del Rio *et al.*, 2007; Henri *et al.*, 2007; Bedoui *et al.*, 2009b; Henri *et al.*, 2010). Zudem ist der Phänotyp beider Zellpopulationen sehr ähnlich, was zu der Annahme führte, dass die Zellen eventuell den gleichen Ursprung haben. *In vivo* wird die Rolle der $CD8^+$ sowie $CD103^+$ DC in der Kreuzpräsentation besonders in *Batf3*-defizienten Tieren deutlich. Diesen Tieren fehlt der Großteil der $CD8^+$ und $CD103^+$ DC (Hildner *et al.*, 2008; Edelson *et al.*, 2010). Konventionelle DC *Batf3*-defizienter Tiere können in einem klassischen *in vitro* Kreuzpräsentations-Assay $CD8^+$ T-Zellen nicht zur Proliferation anregen. Vor allem können diese Tiere keine zytotoxische $CD8^+$ T-Zell-Antworten gegen das West-Nil Virus und bestimmte Tumorarten generieren.

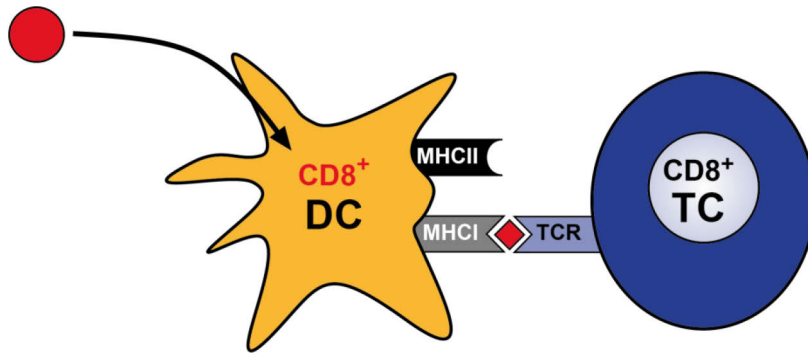


Abb. 3 Kreuzpräsentation von Antigenen

Nimmt eine murine CD8⁺ dendritische Zelle (DC) Antigene aus der Umgebung auf, kann sie diese prozessieren und Fragmente über MHC Klasse I-Moleküle (MHC) an zytotoxische CD8⁺ T-Zellen (TC) präsentieren. Diese Art der Präsentation wird Kreuzpräsentation genannt. TCR: T-Zellrezeptor

Die Fähigkeit zur Kreuzpräsentation durch humane DC wurde bisher lediglich von DC bestimmt, die aus CD34⁺ Vorläuferzellen oder MoDC generiert wurden sowie von einzelnen DC-Subtypen (Romani *et al.*, 1994; Sallusto und Lanzavecchia, 1994; Schnurr *et al.*, 2005; Hoeffel *et al.*, 2007; Di Pucchio *et al.*, 2008). Dabei wurde gezeigt, dass DC generell zur Kreuzpräsentation fähig sind. Es lag bis zum Beginn dieser Arbeit keine Studie vor, in der die Kreuzpräsentation primärer CD1c⁺, CD16⁺ und CD141⁺ DC-Subtypen verglichen wurde.

1.3 Der Chemokinrezeptor XCR1

Damit eine zytotoxische Immunantwort durch die Kreuzpräsentation ausgelöst werden kann, müssen Zellen, die extrem selten im Körper vorkommen, aufeinandertreffen: Antigen-kreuzpräsentierende DC mit naiven antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen. Die Migration dieser (und anderer) Zellen wird durch Chemokine und deren Rezeptoren gesteuert (Thaiss *et al.*, 2011).

Chemokine und ihre Rezeptoren werden in vier Familien unterteilt, abhängig von der Anzahl und Position von konservierten Cysteinresten: CXC, CC, C, und CX3C (Rollins *et al.*, 1997; Bacon *et al.*, 2002; Murphy *et al.*, 2000). Weiterhin können Chemokine funktionell gegliedert werden, nach ihrer Aktivität in der Homöostase oder Inflammation. Chemokine sind sehr kleine (8-12 kDa) Polypeptide, die andere Zellen durch Bindung an spezifische Rezeptoren anlocken können. Diese Chemokinrezeptoren sind G-Protein-gekoppelte Transmembranproteine, die gemäß der Klasse der Chemokine, die an sie binden, benannt werden.

Ursprünglich wurde XCL1 (auch *activation-induced, T cell derived and chemokine-related molecule/ATAC* genannt) als Gen humaner T-Zellen identifiziert, dass nach Stimulation exprimiert wird (Müller *et al.*, 1995). Unabhängig davon wurde es als *single cystein motif-1* (SCM-1; Yoshida *et al.*, 1995) beschrieben und das murine Homolog *lymphotactin* entdeckt (Kelner *et al.*, 1994; Kennedy *et al.*, 1995).

Das murine Chemokin/Chemokinrezeptor-Paar XCL1/XCR1 hat einige besondere Eigenschaften, die es von anderen Chemokinen/Chemokinrezeptoren abgrenzt: (i) Der Chemokinrezeptor XCR1 und dessen Ligand XCL1 sind die einzigen Moleküle der Gruppe der C-Chemokine/Chemokinrezeptoren (Yoshida *et al.*, 1998; Shan *et al.*, 2000; Murphy *et al.*, 2000). (ii) Das Chemokin XCL1 bindet ausschließlich an den XCR1-Rezeptor und dieser hat keine weiteren Liganden. (iii) XCL1 wird in der angeborenen Immunantwort von aktivierten NK-Zellen, während der adaptiven Immunantwort von Th1-polarisierten CD4⁺ T-Zellen sowie aktivierten CD8⁺ T Zellen sekretiert (Dorner *et al.*, 2002). (iv) Der Rezeptor XCR1 wird selektiv auf CD8⁺ DC und zu einem kleinen Prozentsatz auf DN DC exprimiert (Dorner *et al.*, 2009). Eine derart spezifische Expression eines Oberflächenproteins ist von keinem bisher beschriebenen Rezeptor der DC bekannt.

Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass XCL1 spezifisch XCR1-tragende CD8⁺ DC anlockt (Dorner *et al.*, 2009). Weiterhin spielt XCL1 eine Rolle in der Interaktion zwischen DC und T-Zellen nach Antigenkontakt. XCL1 erhöht die Anzahl an antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen sowie deren Kapazität IFN- γ zu sekretieren. Fehlt XCL1, ist die Entwicklung der Zytotoxizität gegen Antigene, die von CD8⁺ DC kreuzpräsentiert werden, vermindert (Dorner *et al.*, 2009).

Im humanen System sind zwei Liganden des Chemokinrezeptors XCR1 bekannt, XCL1 und XCL2, die sich aber lediglich in zwei Aminosäuren unterscheiden (Yoshida *et al.*, 1996). XCL1 wird von humanen aktivierten T-Zellen, $\gamma\delta$ T-Zellen und NK Zellen sekretiert (Müller *et al.*, 1995; Boismenu *et al.*, 1996; Hedrick *et al.*, 1997; Stievano *et al.*, 2003). Es wurde *in vitro* demonstriert, dass XCL1 eine chemotaktische Wirkung auf humane XCR1-Transfektanten hat (Yoshida *et al.*, 1998). Zur Expression von XCR1 im Menschen und zu dessen Funktion *in vivo* war bisher nichts bekannt.

1.4 Ziel der Arbeit

Die Expression des Chemokinrezeptors XCR1 sowie die Charakterisierung der XCR1-positiven Zellen sollten den Kern dieser Arbeit bilden. Dabei sollten die folgenden Aspekte untersucht werden:

- (1) Die Expression von XCR1 auf murinen und humanen Zellen
- (2) Der Phänotyp der XCR1-positiven Zellen
- (3) Die Abhängigkeit der Entwicklung von murinen XCR1-positiven Zellen von bestimmten Molekülen, wie Transkriptionsfaktoren
- (4) Die Funktion der murinen und humanen XCR1-tragenden Zellen

2 Materialien und Methoden

2.1 Chemikalien und Plastikprodukte

Die verwendeten Chemikalien waren ausschließlich von der Qualität p.A. und wurden von den Firmen Carl Roth GmbH (Karlsruhe), Merck Chemicals (Darmstadt) und Sigma-Aldrich (Deisenhofen) erhalten. Steriles Plastikeinwegmaterial wurde von den Firmen Greiner GmbH (Frickenhäusen), Nunc (Roskilde, Dänemark) und Sarstedt (Nümbrecht) bezogen.

2.2 Probenmaterialien

2.2.1 Mäusstämme

Die Mäusstämme wurden in einer spezifiziert pathogenfreien (SPF) Zucht des Bundesinstitutes für Risikobewertung (BfR, Berlin) gezüchtet und gehalten. Vor Experimenten wurden sie kurzzeitig in einem konventionellen Tierstall des Robert Koch-Institutes untergebracht. Die Tiere wurden in einem Alter von 8-12 Wochen verwendet, soweit es nicht anders angegeben ist. Alle Tierexperimente erfolgten in Übereinstimmung mit dem Deutschen Tierschutzgesetz (BGBI. I S. 1206, 1313; 2006) und waren von der lokalen Ethikkommission genehmigt. Eine Übersicht der verwendeten Mäusstämme ist in Tab. 2 gegeben.

Tab. 2 Mäusstämme

Mäusstamm	Beschreibung	Quelle	Bezeichnung in dieser Arbeit
C57BL/6NCrl	Wildtypischer Inzucht-Mäusstamm	Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin	C57BL/6
B6.PL.OT-I	Transgene Mäuse, deren T-Zell-Rezeptor der CD8 ⁺ T-Zellen spezifisch für das Ovalbuminpeptid OVA ₂₅₄₋₂₆₇ ist (Hogquist <i>et al.</i> , 1994), gekreuzt mit C57BL/6.PL Mäusen zur Identifizierung spezifischer CD8 ⁺ T-Zellen über den Rezeptor CD90.1.	Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin B6.PL Mäuse: Jackson Laboratories, Bar Harbor, USA	OT-I

Mausstamm	Beschreibung	Quelle	Bezeichnung in dieser Arbeit
B6.PL.OT-II	Transgene Mäuse, deren T-Zell-Rezeptor der CD4 ⁺ T-Zellen spezifisch für das Ovalbuminpeptid OVA ₃₂₃₋₃₃₉ ist (Barnden <i>et al.</i> , 1998), gekreuzt mit C57BL/6.PL Mäusen zur Identifizierung spezifischer CD4 ⁺ T-Zellen über den Rezeptor CD90.1.	Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin B6.PL Mäuse: Jackson Laboratories	OT-II
B6.XCR1:LacZ	Mausstamm, bei dem die bakterielle β -Galaktosidase unter der Kontrolle des endogenen XCR1-Promotors exprimiert wird. Die kodierende Sequenz des XCR1-Rezeptors wurde ersetzt, so dass homozygote B6.XCR1:LacZ-Mäuse XCR1-defizient sind. Die Tiere sind auf den C57BL/6 Hintergrund zurückgekreuzt.	Hergestellt von Deltagen, Inc., San Carlos, USA; bezogen von Jackson Laboratories	B6.XCR1:LacZ
CX3CR1 ^{GFP}	Mausstamm auf dem C57BL/6 Hintergrund, bei dem grün fluoreszierendes Protein (eGFP) unter der Kontrolle des endogenen CX3CR1-Promotors exprimiert wird. Bei homo- und heterozygoten Tieren fluoreszieren diese Zellen durch das produzierte eGFP nach Anregung mit einem 488 nm Laser. Homozygote Tiere sind CX3CR1-defizient (Jung <i>et al.</i> , 2000).	zur Verfügung gestellt von M. Gunzer, Molekulare Immunologie, Universität Magdeburg, Magdeburg	CX3CR1:GFP
Lang-EGFP	Mausstamm auf dem C57BL/6 Hintergrund, bei dem eGFP unter der Kontrolle des endogenen CD207-Promotors exprimiert wird. Bei homo- und heterozygoten Tieren fluoreszieren diese Zellen durch das produzierte GFP nach Anregung mit einem 488 nm Laser. Homozygote Tiere sind CD207-defizient (Kissenpfennig <i>et al.</i> , 2005).	zur Verfügung gestellt von P. Stoitzner, Universitätsklinik für Dermatologie und Venerologie, Innsbruck, Österreich	CD207:GFP

Mausstamm	Beschreibung	Quelle	Bezeichnung in dieser Arbeit
BALB/cAnNCrI	Wildtypischer Inzucht-Mausstamm (Albino)	Charles River, Wilmington, USA	BALB/c
129/SvPasCrl	Wildtypischer Inzucht-Mausstamm	Charles River	129/Sv WT
129Sv. <i>Batf3</i> KO	Mausstamm auf dem 129/Sv Hintergrund, in dem die Exons eins bis zwei des Transkriptionsfaktors <i>basic leucine zipper transcription factor, ATF-like 3 (Batf3)</i> deletiert sind. Dadurch wird in den Tieren kein Batf3-Protein exprimiert (Hildner <i>et al.</i> , 2008).	zur Verfügung gestellt von H.C. Probst, Institut für Immunologie, Universität Mainz, Mainz	<i>Batf3</i> KO
129Sv.ICSBP KO	Mausstamm auf dem 129/Sv Hintergrund, in dem das Exon zwei des Transkriptionsfaktors <i>Interferon consensus sequence binding protein (ICSBP/IRF-8)</i> deletiert ist. Dadurch wird in den Tieren kein IRF-8-Protein exprimiert (Holtschke <i>et al.</i> , 1996).	Zur Verfügung gestellt von R. Blasig, Leibniz Institut für molekulare Pharmakologie, Berlin	<i>Irf-8</i> KO

2.2.2 Humane Blutpräparate

Leukozytenreiches Blut (*buffy coats*) gesunder Spender wurde vom Deutschen Roten Kreuz (Dresden) zur Verfügung gestellt. Leukozytenkonzentrate (Leukapherese-Produkte) präoperativer Eigenblutspender wurden vom Institut für Transfusionsmedizin des Universitätskrankenhauses Charité (Berlin) erhalten. Vollblut wurde von Labormitarbeitern gespendet. Blutspender wurden schriftlich informiert und die Nutzung der Proben durch den lokalen Ethikausschuss bewilligt.

2.2.3 Monoklonale Antikörper

Monoklonale Antikörper (mAk) wurden aus den Überständen von kultivierten Hybridomen gewonnen und aufgereinigt. Sie wurden zur Anreicherung (magnetisch-aktivierte Zellsortierung, durchflusszytometrische Sortierung) oder Detektion (Durchflusszytometrie, Enzymgekoppelter Immunabsorptions Assay) an diverse Fluorophore, Biotin oder

Digoxigenin (DIG) gekoppelt. Vor Verwendung wurden die mAk titriert und eine optimale Konzentration mit hoher Signal-zu-Hintergrund Trennung ermittelt. Monoklonale Ak, von denen keine eigenen Hybridome vorhanden waren oder die an besondere Farbstoffe gekoppelt sein sollten, wurden kommerziell erworben. Die verwendeten mAk sind in Tab. 3 (anti-murin) und Tab. 4 (anti-human) aufgelistet.

Tab. 3 Anti-murine monoklonale Antikörper

Antigenspezifität	Klonbezeichnung	Quelle	Referenz
CD3	KT3	Hybridom	Tomonari <i>et al.</i> , 1988
CD4	GK1.5	Hybridom	ATCC: TIB 207
CD4	YTS 191.1	Hybridom	ECACC: 87072282
CD8	53-6.72	Hybridom	ATCC: TIB 105
CD11b	5C6	Hybridom	ATCC: CRL-1969
CD11c	N418	Hybridom	ATCC: HB-224
CD16/CD32	2.4G2	Hybridom	ATCC: HB-197
CD19	1D3	Hybridom	ATCC: HB-305
CD24	M1/69.16.11.HL	Hybridom	ATCC: TIB-125
CD25	2E4	Hybridom	Ortega <i>et al.</i> , 1984
CD44	IM7.8.1	Hybridom	ATCC: TIB 235
CD45R (B220)	RA3-6B2	Hybridom	Coffman <i>et al.</i> , 1982
CD69	H1.2F3	kommerziell	eBioscience
CD86	GL1	Hybridom	ATCC: HB-253
CD90.1 (Thy1.1)	Ox-7	Hybridom	ECACC: 84112008
CD103	M290	kommerziell	BD Bioscience
CD172a (SIRPα)	P84	kommerziell	BD Bioscience
CD205 (DEC-205)	NLDC-145	Hybridom	Kraal <i>et al.</i> , 1986
CD207 (Langerin)	eBioRMUL.2	kommerziell	eBioscience
CD207 (Langerin)	929F3	kommerziell	Dendritics
CD278 (ICOS)	MIC-280	Hybridom	Löhning <i>et al.</i> , 2003
CD293 (PD-1)	J43	kommerziell	eBioscience
Clec9A (DNDR-1)	24/04-10B4	I. Caminschi/ M. Lahoud, The Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research, Parkville, Australien	Caminschi <i>et al.</i> , 2008
Clec9A (DNDR-1)	1F6	C. Reis e Sousa, London Research Institute, London,	Sancho <i>et al.</i> , 2008

Antigenspezifität	Klonbezeichnung	Quelle	Referenz
		Großbritannien	
Ly6G/C	RB6-8C5	Hybridom	Hestdal <i>et al.</i> , 1991
MHC II	M5/114.15.2	kommerziell	eBioscience
MHC II	M5/114.15.2	Hybridom	ATCC: TIB 120
NK1.1	Pk136	kommerziell	BD PharMingen
XCR1	MARX10	Hybridom	Bachem <i>et al.</i> , 2012

Hybridom: laboreigene Hybridome, aus deren Überständen monoklonale Antikörper gewonnen wurden; ATCC: American Type Culture Collection; ECACC: European Collection of Cell Cultures

Tab. 4 Anti-humane monoklonale Antikörper

Antigenspezifität	Klonbezeichnung	Quelle	Referenz
CD1c	AD5-8E7	kommerziell	Miltenyi Biotec
CD3	OKT3	Hybridom	ATCC: CRL-8001
CD11c	BU15	kommerziell	BioLegend
CD14	63D3	Hybridom	Ugolini <i>et al.</i> , 1980
CD15	W6D3	kommerziell	BioLegend
CD16	3G8	kommerziell	BioLegend
CD19	BU12	Hybridom	Flavell <i>et al.</i> , 1995
CD45	HI30	kommerziell	BioLegend
CD56	HCD56	kommerziell	BioLegend
CD141	AD5-14H12	kommerziell	Miltenyi Biotec
CD304	AD5-17F6	kommerziell	Miltenyi Biotec
HCMV pp65	CH12	kommerziell	Santa Cruz Biotechnology
HLA-A*0201	BB7.2	kommerziell	BioLegend
HLA-DR	L243	Hybridom	ATCC: HB-55
IFN-γ	4SB3	Hybridom	ECACC: 92030610
IFN-γ	7R2A4	Hybridom	Maeger, 1987

Hybridom: laboreigene Hybridome, aus deren Überständen monoklonale Antikörper gewonnen wurden; ATCC: American Type Culture Collection; ECACC: European Collection of Cell Cultures

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Quantitative *real time*-Polymerase Kettenreaktion

Das Expressionsniveau von XCR1-mRNA wurde durch quantitative *real time*-Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR) ermittelt. Dazu wurde die Gesamt-RNA der Proben mit dem *High Pure RNA Isolation Kit* (Roche Applied Science, Mannheim) aufgereinigt. Die Konzentration, Reinheit und Integrität der RNA wurde mit dem 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, USA) sowie photometrisch mit dem NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific,

Schwerte) gemessen. Zur Bestimmung des XCR1-Niveaus wurden 100 ng Gesamt-RNA mit Hilfe von *random hexamer* Primern und des *AMV Reverse Transcription Systems* (Promega, Mannheim) in cDNA umgeschrieben. Die cDNA muriner Proben wurde durch die qRT-PCR mit den in Tab. 5 aufgelisteten Primer-Sonde Sets analysiert, die cDNA humaner Proben mit den in Tab. 6 aufgelisteten Primer-Sonde Sets. Falsch-positive Ergebnisse durch Kontamination mit genomischer DNA wurden vermieden, indem Primer zur Exon-überspannenden Amplifikation verwendet wurden.

Tab. 5 Primer-Sonde Sets zur quantitativen Bestimmung der murinen XCR1-Expression

PCR	Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
Murines XCR1 Set	muXCR1 V	CCTACGTGAAACTCTAGCACTGG
	muXCR1 R	AAGGCTGTAGAGGACTCCATCTG
	muXCR1 S	FAM-TACAGACTTGAAACCC-MGB
Murines β-2-Mikro-globulin (Kontroll-PCR)	muβ2MG V	ATTCACCCCCACTGAGACTGA
	muβ2MG R	CTCGATCCCACTAGACGGTC
	muβ2MG S	FAM-TGCAGAGTTAAGCATGCCAGTATGGCCG-TAMRA

mu: murin; V: Vorwärtsprimer; R: Rückwärtsprimer; S: Sonde; β2MG: β-2-Mikroglobulin

Tab. 6 Primer-Sonde Sets zur quantitativen Bestimmung der humanen XCR1-Expression

PCR	Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
Humanes XCR1 Set 1 (Exon überspannend)	huXCR1 V1	TCAAGACGCATGTAAAGAGGTGTAG
	huXCR1 R1	GTTGCCTGAGGACTCCATCTG
	huXCR1 S1	FAM-TGCTCTAAACGTCCCTGCCATCTGGT-TAMRA
Humanes XCR1 Set 2 (innerhalb des kodierenden Bereiches)	huXCR1 V2	TTGCCTGTGTGGATCTCCC
	huXCR1 R2	CGGTGGATGGT CATGATGG
	huXCR1 S2	FAM-CATCAGCCTCTACAGCAGCATCTTCTTCCT-TAMRA
Humanes β-2-Mikro-globulin (Kontroll-PCR)	huβ2MG V	GCCGTGTGAACCATGTGACT
	huβ2MG R	CGGCATCTTCAAACCTCCA
	huβ2MG S	FAM-TAAGTGGGATCGAGACATGTAAGCAGCATC-TAMRA

hu: human; V: Vorwärtsprimer; R: Rückwärtsprimer; S: Sonde; β2MG: β-2-Mikroglobulin

Als Positivkontrolle wurde die Amplifizierung der β-2-Mikroglobulin cDNA durchgeführt. Um Standards zur mRNA/cDNA Kopienzahlbestimmung herzustellen, wurde sowohl das murine als auch das humane XCR1-PCR-Fragment amplifiziert und mit dem *Clone-JET PCR cloning* Kit (Fermentas, St. Leon-Rot) in den pJET1.2 Vektor kloniert. Für die quantitative

PCR wurden Primer mit 10 µl *ABsolute QPCR Mix* inklusive *low ROX* (ABgene, Hamburg) gemischt und 1/10 der cDNA in einer 20-µl PCR-Reaktion eingesetzt. Die PCR wurde am 7500 *Fast Real-Time* PCR System (Applied Biosystems, Darmstadt) mit einer initialen Enzymaktivierung bei 95 °C für 15 min, gefolgt von 40 Amplifizierungszyklen (95 °C für 15 sec und 60 °C für 1 min), durchgeführt.

2.3.2 Enzymgekoppelter Immunabsorptions Assay

Die Konzentration des Zytokins IFN- γ in Kulturüberständen wurde durch einen spezifischen Enzym-gekoppelten Immunabsorptions Assay (ELISA) bestimmt. Hierzu wurden ELISA-Platten mit 5 µg/ml anti-IFN- γ mAk beschichtet (Klon 4SB3; siehe Tab. 4). Freie Bindungsstellen wurden mit BSA abgesättigt und anschließend mit den zu untersuchenden Zellkulturüberständen inkubiert. Als Standard wurde rekombinantes IFN- γ -Protein (Biosource, Solingen) in einer Konzentration von 15,6 pg/ml bis 2 000 pg/ml verwendet. Die Detektion des gebundenen Zytokins erfolgte mit einem zweiten biotinylierten anti-IFN- γ mAk (Klon 7R2A4; 2 µg/ml; siehe Tab. 4). Die Proben wurden anschließend mit Streptavidin-konjugierter Meerrettichperoxidase (Jackson Immuno Research, West Grove, USA) inkubiert. Die Menge des gebundenen Zytokins wurde in einer Farbreaktion durch den Vergleich mit einer Standardreihe bekannter Konzentrationen ermittelt. Hierbei diente 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin als Substrat. Die Farbreaktion wurde durch die Zugabe von 1 M Schwefelsäure gestoppt und die Extinktion bei einer Wellenlänge von 450 nm mit einem ELISA-Platten-Photometer (Dynatech Laboratories, El Paso, USA) gemessen. Zur Auswertung wurde die Revelation 4.21 Software (Dynex Technologies, Denkendorf) verwendet.

2.4 Zellbiologische Methoden

2.4.1 Zelllinien und Zellkulturbedingungen

Die murine prä-B-Zelllinie 300-19 (Al *et al.*, 1981) wurde von B. Moser (Universität Bern, Bern, Schweiz) zur Verfügung gestellt. Diese wurde von A. Mora mit dem Vektor Δ OVA-YFP-pcDNA3 stabil transfiziert. Der Δ OVA-Sequenz fehlen die ersten 137 N-terminalen Aminosäuren des Ovalbumin (OVA), wodurch OVA ausschließlich intrazellulär vorliegt. Der Klon A5 wurde wegen seines hellen gelb fluoreszierenden Protein (YFP)-Signals für alle funktionellen Assays verwendet (Dorner *et al.*, 2009). Murine Flt3 Ligand sekretierende B16 Zellen (Mach *et al.*, 2000) wurden von S. Jung (Abteilung für Immunologie, Weizmann

Institute of Science, Rehovot, Israel) zur Verfügung gestellt. Für Experimente mit humanem Material wurde die Epithelzelllinie HeLa (American Type Culture Collection) verwendet.

Für die Kultivierung primärer muriner Zellen wurde R10F⁺/β-ME Medium (RPMI 1640, 10 % FCS (Biochrom AG, Berlin), 2 mM Glutamin, 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin (beides Invitrogen, Darmstadt), 50 µM β-Mercaptoethanol) verwendet. Für die Kultivierung der murinen Zelllinie 300-19 und der Flt3 Ligand produzierenden B16 Zelllinie wurde dem R10F⁺ Medium 1 mM nicht-essentielle Aminosäuren sowie 1 mM Natriumpyruvat (beides Invitrogen) zugegeben. Dem Medium der 300-19-ΔOVA Transfektante wurde zudem 1 mg/ml Gentamicin (Invitrogen) zur Selektion zugesetzt. Humane primäre Zellen und Zelllinien wurden mit R10F⁺ Medium kultiviert.

2.4.2 Herstellung und Kultivierung humaner CD8⁺ T-Zell-Klone

Humane CD8⁺ T-Zell-Klone, spezifisch für das Peptid_{495–503} des *lower matrix phosphoprotein* (pp65) des humanen Zytomegalievirus (HCMV), wurden nach der Methode von Fonteneau *et al.* (2003) von F. Ebstein (Institut für Biochemie, Universitätskrankenhaus Charité) hergestellt. Die Klone 10 und 61 wurden innerhalb dieser Arbeit verwendet.

2.4.3 Herstellung von humanem zellassoziertem Antigen

Die Herstellung zellassozierten Antigens wurde zusammen mit F. Ebstein durchgeführt. Dazu wurde HCMV pp65-cDNA in den pcDNA3.1/myc-His Vektor kloniert. Hiervon wurden 24 µg mit 24 µl Lipofectamine 2000 in 3 ml Opti-MEM Medium (beides Invitrogen) gemischt und damit 2x10⁶ HeLa-Zellen über Nacht transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden trypsiniert (PBS, 0,05 % Trypsin, 0,04 % EDTA), auf eine Zelldichte von 2x10⁶/ml in R10F⁺ eingestellt und einem viermaligen Einfrier- und Auftauzyklus unterzogen.

Die Transfektionseffizienz wurde mittels Western Blot von 5 µg Lysat (BCA Protein Assay; Thermo Fisher Scientific, Schwerte) mit dem monoklonalen Antikörper CH12 (siehe Tab. 4) ermittelt.

2.4.4 Präparation primärer Zellen

2.4.4.1 Isolierung von Zellen aus murinen lymphoiden Organen

Zur Isolierung lymphoider Zellen der Milz, des Thymus und der Haut-dränierenden LN wurden Mäuse durch zervikale Dislokation getötet. Die Organe wurden präpariert und in

kleinen Stücken in PBS (136,89 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 1,47 mM KH_2PO_4 , 8,05 mM Na_2HPO_4 ; pH 7,3) durch ein 70 μm Sieb gedrückt. Erythrozyten der Milz wurden durch ACK-Puffer (0,15 mM NH_4Cl , 10 mM KHCO_3 , 0,1 mM Na_2EDTA ; pH 7,2) 1 min lysiert. Die lymphoiden Zellen wurden je nach weiterer Verwendung in PBS/BSA (PBS, 0,5 % BSA (Fraktion V, Endotoxingehalt <1 EU/mg; PAA Laboratories, Cölbe)) mit oder ohne NaN_3 aufgenommen und mit dem Guava PCA (Millipore, Billerica, USA) die Zellzahl bestimmt. Die Messung der mit Viacount Reagenz (2,5 $\mu\text{g/ml}$ LDS-751, 1 $\mu\text{g/ml}$ Propidiumiodid, 5 mM EDTA, 0,05 % NaN_3 , in PBS; pH 7,2) verdünnten Zellen erfolgte nach 3 min und die Ermittlung der Anzahl nukleärer lebender Zellen wurde mit der ViaCount Software (Millipore, Billerica, USA) durchgeführt.

2.4.4.2 Isolierung von Zellen aus muriner Haut

Zur Aufarbeitung der Haut wurden Mäuse durch zervikale Dislokation getötet. Das Fell wurde an Bauch und Rücken gezupft, die unbehaarte Haut großflächig abgeschnitten und das Fett auf der Innenseite der Haut mit einem Skalpell entfernt. Zur Herstellung von Einzelzellsuspensionen für durchflusszytometrische Messungen wurden die fettfreien Hautlappen in 2x2 cm große Stücke geschnitten. Diese wurden in 24-Napf Platten auf Hanks Medium (0,137 M NaCl, 5,4 mM KCl, 0,25 mM Na_2HPO_4 , 0,44 mM KH_2PO_4 , 4,2 mM NaHCO_3) gelegt, Liberase TM (0,15 mg/ml) und DNase I (0,12 mg/ml; beides Roche Applied Science) zugegeben und 1 h schüttelnd bei 37 °C inkubiert. Der Verdau wurde mit 5 mM EDTA abgestoppt und die Lösung durch ein 100 μm Sieb gedrückt. Die Zellen wurden zweimal mit DNase-haltigem Puffer (1 % BSA, 20 $\mu\text{g/ml}$ DNase I, 5 mM EDTA) gewaschen und in PBS/BSA mit NaN_3 aufgenommen. Zur Homogenisierung der Haut für die qRT-PCR wurde die Haut nach Entfernen des Fells mit einem Ultra-Turrax T8 (IKA Laborwerke, Staufen) zerkleinert.

2.4.4.3 Anreicherung dendritischer Zellen der murinen Milz

Die Frequenz der cDC der murinen Milz beträgt ca. 1 % der lebenden Zellen nach Standardisolation (Kapitel 2.4.4.1). Zur Anreicherung wurden mehrere Methoden kombiniert. Die nötige Anreicherung wurde jeweils durch das experimentelle Ziel bestimmt. Der erste Anreicherungsschritt beinhaltete einen Verdau zerkleinerter Milzstücke mit Collagenase D (0,5 mg/ml) und DNase I (20 $\mu\text{g/ml}$; beides Roche Applied Science) in RPMI mit 2 % FCS. Die Stücke wurden schüttelnd für 25 min bei 37 °C inkubiert und für weitere

5 min wurde 10 mM EDTA zugegeben. Die Milzstücke wurden durch 70 µm Siebe gedrückt, um eine Einzelzellsuspension herzustellen. Sollten die Zellen direkt nach diesem Anreicherungsschritt verwendet werden, wurden diese mit ACK Puffer von Erythrozyten befreit. Die Frequenz der DC wurde dadurch auf ca. 2 % der isolierten Splenozyten erhöht.

Weiter angereichert wurden DC durch eine Dichtegradientenzentrifugation (DGZ). Hierzu wurden Splenozyten in 15 ml NycoPrep (14,1 ml 1.077 g/ml, Axis Shield, Heidelberg, 0,9 ml PBS (PAA, Cölbe); Dichte 1,073 g/ml) resuspendiert und mit dieser Suspension 5 ml NycoPrep überschichtet. Eine dritte Schicht wurde aus 4 ml R10F⁺/β-ME zugefügt. Die Gradienten wurden bei 1700 x g für 10 min bei 4 °C ohne Bremse zentrifugiert. Die Interphase, in der sich Zellen geringer Dichte befinden, wurde abgenommen und mehrmals mit PBS gewaschen. Die somit auf ca. 10 % angereicherten DC konnten direkt verwendet werden oder weiter durch magnetisch-aktivierte Zellsortierung (MACS) angereichert werden (siehe Kap. 2.4.4.4).

2.4.4.4 Magnetisch-aktivierte Zellsortierung muriner Proben

Es wurden murine DC-Subtypen, CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen durch MACS (Miltenyi *et al.*, 1990) angereichert.

DC wurden, wie in Kap 2.4.4.1 beschrieben, durch Verdau und DGZ vorangereichert und dann mit CD11c-Magnetpartikeln (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) sortiert. Dazu wurden die Fc-Rezeptoren der Zellen für 5 min mit 100 µg/ml des mAk CD16/CD32 sowie 50 µg/ml Ratten Ig (Nordic, Tilburg, Niederlande) blockiert. Dann wurden 2x10⁸ Zellen/ml mit optimal titrierten CD11c-Magnetpartikeln in PBS/BSA für 15 min inkubiert.

CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen wurden aus Milzen von OT-II bzw. OT-I transgenen Mäusen sortiert. Zu 1x10⁸ Zellen/ml wurden optimale Konzentrationen der folgenden biotinylierten mAk zugegeben: anti-murines-CD4 (Klon: GK1.5; ausschließlich bei CD8⁺ T-Zell-Sortierung), anti-murines-CD8 (ausschließlich bei CD4⁺ T-Zell-Sortierung), -CD11b, -CD11c, -B220, und -NK.1.1 (bei beiden Sortierungen; zur Erklärung der mAk siehe Tab. 3). Nach einem Waschschrift wurden 2x10⁸ Zellen/ml mit anti-Biotin Magnetpartikeln, 100 µg/ml CD16/CD32 und 50 µg/ml Ratten Ig inkubiert.

Nach Inkubation mit den entsprechenden Partikeln wurden die Zellen zweimal mit PBS/BSA gewaschen und durch eine ferromagnetische Säulenmatrix (MidiMACS, Miltenyi Biotec) separiert. Die Reinheit der Zellfraktionen wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

2.4.4.5 Isolierung von Zellpopulationen aus dem humanen peripheren Blut

PBMC wurden zur Isolierung in einem ersten Schritt durch DGZ angereichert. Zellpopulationen, die in geringen Frequenzen in PBMC vorliegen, wurden in einem zweiten Schritt durch MACS angereichert. Sowohl diese angereicherten Zellen, als auch Zellen, die in hoher Frequenz in PBMC vorkommen, wurden anschließend durchflusszytometrisch sortiert. Granulozyten wurden direkt nach der Lyse von Erythrozyten mit ACK Puffer aus Vollblut isoliert. Die Strategien zur Anreicherung einzelner Zelltypen aus PBMC sind in Tab. 7 dargestellt.

Tab. 7 Isolierungsstrategien von Zellpopulationen aus dem humanen peripheren Blut

Zellpopulation	Anreicherung der PBMC	Magnetische Zellsortierung (Miltenyi Biotec)	Durchflusszytometrische Zellsortierung (ARIA II)
T-Zellen	DGZ	-	CD3 ⁺ , CD19 ⁻ , CD141 ⁻
B-Zellen	DGZ	-	CD19 ⁺ , HLA-DR ⁺ , CD3 ⁻ , CD141 ⁻
NK-Zellen	DGZ	-	CD16 ⁺ , CD56 ⁺ , CD3 ⁻ , CD141 ⁻ , HLA-DR ⁻
Monozyten	DGZ	-	CD14 ⁺ , CD3 ⁻ , CD19 ⁻ , CD141 ⁻
Granulozyten	Erythrozyten-Lyse des Vollblutes	-	CD45 ⁺ , CD15 ⁺ , CD3 ⁻ , CD14 ⁻ , CD19 ⁻ , CD141 ⁻
pDC	DGZ	<i>Plasmacytoid Dendritic Cell Isolation Kit</i>	CD304 ⁺ , HLA-DR ⁺ , CD11c ⁻ , CD141 ⁻ , Lin ⁻
CD1c⁺ DC	DGZ	<i>CD1c (BDCA-1)⁺ Dendritic Cell Isolation Kit</i>	CD1c ⁺ , CD11c ⁺ , HLA-DR ⁺ , CD16 ⁻ , CD141 ⁻ , Lin ⁻
CD16⁺ DC	DGZ	<i>CD16⁺ Monocyte Isolation Kit</i>	CD16 ⁺ , CD11c ⁺ , HLA-DR ⁺ , CD1c ⁻ , CD141 ⁻ , Lin ⁻
CD141⁺ DC	DGZ	<i>CD141 (BDCA-3) MicroBead Kit</i>	CD141 ⁺ , CD11c ⁺ , HLA-DR ⁺ , CD1c ⁻ , CD16 ⁻ , Lin ⁻
MoDC	DGZ	<i>CD14 MicroBeads</i>	-

PBMC: mononukleäre Zellen des peripheren Blutes; DC: dendritische Zelle(n); pDC: plasmazytoide DC; MoDC: aus Monozyten generierte DC; DGZ: Dichtegradientenzentrifugation; Lin: CD3, CD14, CD19, CD56

2.4.4.6 Anreicherung mononukleärer Zellen aus dem peripheren Blut

PBMC wurden mit Hilfe der DGZ angereichert. Dazu wurden *buffy coats*, Leukaphereseprodukte oder Vollblut bei 400 x g für 30 min bei 18 °C und geringer Bremskraft zentrifugiert. Der Überstand (Plasma) wurde entfernt und die Interphase (Leukozyten)

abgenommen, in ein neues Gefäß überführt und mit PBS aufgefüllt. Jeweils 15 ml Biocoll (Biochrom, Berlin) wurden mit 35 ml Leukozytenlösung überschichtet und bei 400 x g für 30 min bei 18 °C ohne Bremse zentrifugiert. Die Interphase, in der sich die PBMC befinden, wurde erneut abgenommen und mit PBS gewaschen. Um Thrombozyten abzureichern, wurden die Zellen ein weiteres Mal mit PBS gewaschen (8 min, 380 x g, 18 °C).

2.4.4.7 Magnetisch-aktivierte Zellsortierung humaner Proben

Um die Frequenzen der einzelnen DC-Subtypen zu erhöhen, wurden diese magnetisch aus PBMC angereichert. Es wurden die in Tab. 7 aufgeführten Kits (Miltenyi Biotec) nach Angabe des Herstellers verwendet.

Zur durchflusszytometrischen Sortierung von NK-Zellen und B-Zellen aus PBMC wurden T-Zellen durch MACS abgereichert. Hierzu wurden 1×10^8 Zellen/ml mit optimal titriertem anti-humanen biotinylierten CD3 mAk inkubiert. Nach einem Waschschrift wurden 2×10^8 Zellen/ml mit anti-Biotin Magnetpartikeln und 2 mg/ml Endobulin (Baxter Hyland-Immuno Division, Deerfield, USA) inkubiert. Nach Inkubation mit den entsprechenden Magnetpartikeln wurden die Zellen zweimal mit PBS/BSA gewaschen und durch eine ferromagnetische Säulenmatrix (MidiMACS, Miltenyi Biotec) separiert. Die Reinheit der Zellfraktionen wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

2.4.4.8 Generierung von dendritischen Zellen aus Monozyten

Für die Herstellung von MoDC wurden primäre Monozyten aus PBMC mit CD14-Magnetpartikeln (siehe Tab. 7) angereichert und für 5 d in R10F⁺ Medium bei einer Zellkonzentration von $0,25 \times 10^6$ bis 1×10^6 Zellen/ml kultiviert, welches mit 800 U/ml IL-4 und 1000 U/ml GM-CSF versetzt war.

2.5 Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie ist es möglich, die Expression von Oberflächenmolekülen auf Einzelzellebene zu untersuchen (Radbruch, 2000). Zur Markierung von zellspezifischen Molekülen wurden fluorophorgekoppelte mAk (siehe Tab. 3 und Tab. 4) verwendet. Die verwendeten Fluorochrome, deren Absorptions- und Emissionsmaxima, sowie die Laser und Bandpass-(BP) Filter der Durchflusszytometer sind in Tab. 8 dargestellt. Für die Analyse von Einzelzellsuspensionen wurde das LSRII verwendet; zur Sortierung einzelner

Zellpopulationen des FACSAria II (beide von BD Biosciences, Heidelberg). Die Daten wurden mit der FlowJo Software (Tree Star, Inc., Ashland, USA) analysiert.

Tab. 8 Fluorophore und ihre Absorptions-/Emissionsmaxima

Fluorochrome	Laser [nm]	Absorptions-Maximum [nm]	Emissions-Maximum [nm]	BD Filter (LSRII)	BD Filter (FACS ARIAI)
FITC, CFSE, FDG, GFP, YFP	488	495	520	530/30	530/30
PE	488	496	573	585/42	585/42
PerCP	488	482	678	658/40	658/40
PE-Cy7	488	496	767	780/60	780/60
A647, APC, Cy5	633	647/649	665/667	670/14	660/20
A700	633	702	723	720/30	720/30
APC-Cy7, APC-A750	633	625-650	767	780/60	780/60
PacB, DAPI	405	405/358	455/460	440/40	440/40
PacO, CasY, DAPI	405	400/358	551/460	562/40	562/40

BP: Bandpassfilter. Emissionsmaxima wurden zusammengestellt anhand von Daten von BD Bioscience und Molecular Probes.

2.5.1 Färbung von Oberflächenantigenen

Zur Färbung von Oberflächenantigenen wurden 5×10^7 Zellen/ml in PBS/BSA mit 0,1 % NaN_3 eingesetzt und alle Schritte auf Eis durchgeführt. Um unspezifische Bindungen der mAk an Fc-Rezeptoren zu blockieren, wurden murine Zellen vor der Färbung mit anti-CD16/CD32 mAk, humane Zellen mit 2 mg/ml Endobulin (Baxter Hyland-Immuno Division) für 5 min inkubiert. Zur Färbung wurden fluorophorgekoppelte mAk für 20 min zugegeben (Tab. 3 für anti-murine; Tab. 4 für anti-humane mAk). Die mAk gegen Clec9A (DNDR-1) wurden für 20 - 30 min bei 37 °C verwendet. Neben direkt an Fluorophore gekoppelten mAk wurden Biotin- und DIG-gekoppelte mAb verwendet. Deren Detektion wurde mit an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppeltem Streptavidin bzw. anti-DIG mAk für 5 bzw. 20 min ermöglicht. Zur Oberflächenfärbung von XCR1 wurde an verschiedene Fluorophore gekoppeltes XCL1 (hergestellt von H.W. Mages) zu der jeweiligen Antikörper-Färbung zugegeben. Im Verlauf dieser Arbeit wurde von E. Hartung ein mAk gegen murines XCR1 erzeugt (Klon MARX10). Die XCR1-Expression wurde in B6.XCR1:lacZ Tieren durch die Zugabe des Substrats Fluorescein di- β -D-galactopyranosid (FDG) bestimmt. Das lacZ-Gen wird unter Kontrolle des XCR1-Promotors exprimiert (siehe Tab. 2), wodurch β -Galaktosidase gebildet wird. Diese kann das nicht-fluoreszierende FDG sequenziell zu Fluorescein Monogalactosid (FMG) und dem stark fluoreszenten Fluorescein hydrolysieren. Dieses Endprodukt kann durch Anregung mit einem 488 nm Laser bei einer Wellenlänge von 520 nm detektiert werden.

Tote Zellen wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff 4',6'-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI; 0,33 µg/ml; Roche Applied Science, Mannheim) detektiert. Dieser Fluoreszenzfarbstoff dringt generell durch die Zellmembran ein, was bei lebenden Zellen aber äußerst langsam vonstatten geht. Dadurch dringt DAPI bei kurzer Inkubationszeit nur in tote Zellen ein, interkaliert in deren DNA und fluoresziert bei Anregung mit einer Wellenlänge von 358 nm (siehe Tab. 8).

2.5.2 Durchflusszytometrische Messung

Zur Analyse der Oberflächenexpression wurden Zellsuspensionen in PBS/BSA unter Zusatz von 0,1 % NaN₃ am Durchflusszytometer gemessen. Zur Sortierung von Zellpopulationen wurde ausschließlich PBS/BSA verwendet und ein *gating*-Schema am FACSaria II erstellt und die Zellen entsprechend der Expression bestimmter Oberflächenmarker sortiert.

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte als Histogramm, schwarz/weißer *Dot Plot* oder als *Contour Plot*, wobei die Zahlen dem prozentualen Anteil der in den *gates* enthaltenen Zellen entspricht. Die standardmäßig durchgeführte Analysestrategie ist in Abb. 4 dargestellt. Es wurde eine geeignete Eingrenzung der Zellen im Vorwärts- und Seitwärts-*scatter* vorgenommen und Dubletten in der Höhe und Fläche der Vorwärts- und Seitwärts-*scatter* für die weitere Analyse ausgeschlossen. Ein Ausschluss toter Zellen erfolgte über eine Färbung mit DAPI. Durch die Belegung der BP-Filter im LSR II und ARIA II wird die Emission von DAPI im PacB- und PacO-Kanal detektiert. Autofluoreszente Zellen der Milz wurden zur Analyse der Lymphozytenpopulationen ebenfalls ausgeschlossen.

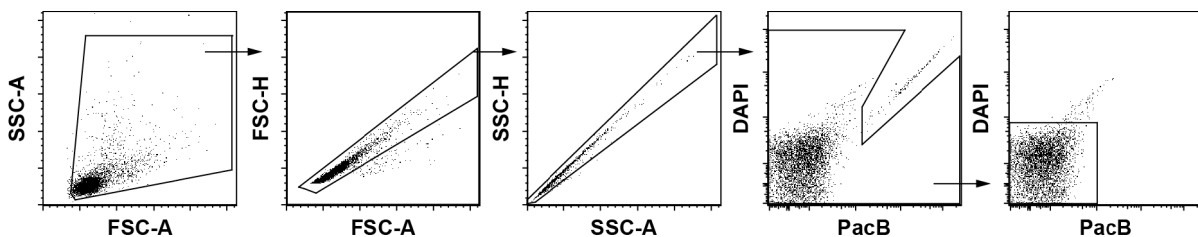


Abb. 4 Eingrenzung der Zellen bei durchflusszytometrischen Messungen

Einzelzellsuspensionen unterschiedlicher Organe wurden präpariert, mit monoklonalen Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch gemessen. Standardmäßig wurde eine Eingrenzung der Zellen im Vorwärts- (FSC) und Seitwärts-*scatter* (SSC) vollzogen. Hierdurch wurden nur Zellen bestimmter Größe und Granularität für die Analyse verwendet. Danach wurden Dubletten durch die Darstellung der Fläche gegen die Höhe der Vorwärts- (FSC) und Seitwärts-*scatter* (SSC) ausgeschlossen. Tote Zellen wurden durch den Farbstoff 4',6'-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI) angefärbt und dann von der Analyse ausgeschlossen. In einem letzten Schritt wurden autofluoreszente Zellen ausgeschlossen.

2.6 Funktionelle Analysen primärer dendritischer Zellen

2.6.1 Aufnahme von zellassoziertem Antigen durch murine dendritische Zellen

C57BL/6 Mäusen wurden 10×10^6 300-19- Δ OVA Zellen (Abschnitt 2.4.1) in 200 μ l PBS intravenös (i.v.) injiziert. Vorher wurden 5×10^7 300-19- Δ OVA Zellen für 15 min mit 10 μ M 5- and 6-Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE; Molecular Probes, Eugene, USA) in PBS/BSA bei 37 °C markiert. Nach 2, 4, 12 und 24 h wurde das CFSE-Signal isolierter Splenozyten durchflusszytometrisch analysiert.

2.6.2 Kreuzpräsentation durch murine dendritische Zellen

C57BL/6 Mäusen wurde 2 mg OVA oder 10×10^6 300-19- Δ OVA Zellen (Abschnitt 2.4.1) in 200 μ l PBS i.v. injiziert. Das OVA wurde vor der Injektion mittels *EndoTrap red* (Hyglos Sieigma-Aldrich) von LPS gereinigt, so dass es <0,5 EU Endotoxin/mg Protein enthielt (LAL Test, Charles River). Vierzehn Stunden nach der *in vivo* Beladung wurden die cDC dieser Tiere durch Verdau, DGZ und CD11c-MACS angereichert (siehe Kapitel 2.4.4.3 und 2.4.4.4). Die DC-Subtypen $\text{XCR1}^+\text{CD8}^+$, $\text{XCR1}^+\text{CD8}^-$, $\text{XCR1}^-\text{CD8}^+$ und $\text{XCR1}^-\text{CD8}^-$ wurden durchflusszytometrisch zu einer Reinheit von > 98,5 % sortiert. Dabei wurden sie als $\text{CD11c}^+\text{MHC II}^+\text{Lin}^-$ Zellen definiert (Lin: CD3, CD45R, Ly6G/C).

CD8^+ T-Zellen wurden aus OT-I transgenen Tieren angereichert (Abschnitt 2.4.4.4) und deren Expression von CD25, CD69, PD-1 und ICOS wurde gemessen. Nicht-aktivierte CD8^+ T-Zellen (negativ für die Expression von CD25, CD69, PD-1 und ICOS) wurden mit einer Konzentration von 5×10^7 Zellen/ml für 10 min in PBS/BSA mit 5 μ M CFSE (Molecular Probes) bei 37 °C markiert.

Für *in vitro* Kreuzpräsentationsassays wurden pro Ansatz 1×10^5 CFSE-markierte CD8^+ T-Zellen mit titrierten Mengen an DC-Subtypen (1 000 - 30 000) in $\text{R10F}^+/\beta$ -ME-Medium für 2,5 d inkubiert. Die Proliferation der T-Zellen wurde durch Messung der CFSE-Verdünnung in der Durchflusszytometrie bestimmt, indem $\text{CD90.1}^+\text{CD8}^+\text{MHCII}^-$ Zellen analysiert wurden.

2.6.3 Peptidpräsentation durch murine dendritische Zellen

Prinzipiell wurde der Assay wie im Kapitel 2.6.2 durchgeführt, mit folgenden Unterschieden: Es wurden cDC unbehandelter C57BL/6 Tiere verwendet. Je 1×10^4 Zellen eines DC-Subtyps wurden mit 1 mM $\text{OVA}_{257-264}$ - oder $\text{OVA}_{323-339}$ -Peptid (Apara Bioscience, Denzlingen) für

2 h bei 37 °C in R10F⁺/β-ME-Medium beladen und dreimal gewaschen. OVA₂₅₇₋₂₆₄ kann dabei an die MHC I auf den DC binden, während OVA₃₂₃₋₃₃₉ an die MHC II der DC binden kann. Zu den Peptid-beladenen DC-Subtypen wurden je 1x10⁵ OT-I CD8⁺ oder OT-II CD4⁺ T-Zellen gegeben und für 2,5 d koinkubiert. Die CD8⁺ T-Zellen der OT-I transgenen Tiere können MHC I:OVA₂₅₇₋₂₆₄ erkennen, während die CD4⁺ T-Zellen der OT-II transgenen Tiere MHC II:OVA₃₂₃₋₃₃₉ erkennen können. Die Proliferation der T-Zellen wurde durchflusszytometrisch anhand des CFSE-Profiles bestimmt, wobei sich auf die Analyse der CD90.1⁺CD8⁺MHCII⁻ bzw. CD90.1⁺CD4⁺MHCII⁻ Zellen konzentriert wurde.

2.6.4 Kreuzpräsentation durch humane dendritische Zellen

Die Kreuzpräsentation von pp65-Antigen durch humane DC-Subtypen wurde prinzipiell wie von Fonteneau *et al.* (2003) beschrieben untersucht.

Zur Untersuchung der Kreuzpräsentation von löslichem Antigen durch DC wurde der T-Zell Klon 10 (4x10⁴ Zellen/Napf; Kap 2.4.2) und die sortierten DC-Subtypen CD1c⁺, CD16⁺ und CD141⁺ DC (jeweils 4x10⁴ Zellen/Napf) in 100 µl R10F⁺ Medium koinkubiert. Es wurde rekombinantes pp65-Protein (3 µg/ml; niedriger Endotoxingehalt; Miltenyi Biotec) oder OVA (3 µg/ml) als Kontrolle zugegeben. Da der T-Zell-Klon 10 spezifisch für das pp65-Protein ist, kann er OVA nicht erkennen.

Die Kapazität zur Kreuzpräsentation von zellassoziertem Antigen durch DC wurde bestimmt, indem 5x10⁴ T-Zellen des Klons 61 (Kap. 2.4.2) in 150 µl Gesamtvolumen verwendet wurden, wobei die Anzahl der sortierten DC titriert wurde (3 125 – 50 000 Zellen). Dabei wurde als zellassoziertes Antigen 50 µl HeLa pp65-Lysat eingesetzt (siehe Abschnitt 2.4.3). Als Negativkontrolle diente 1 µg/ml des MART-1₂₇₋₃₅-Peptids. Dieses Peptid stammt aus dem Melanom-assozierten Antigen MART-1 und kann von den pp65-spezifischen T-Zellen nicht erkannt werden.

Die Stärke der T-Zell-Stimulation wurde bestimmt, indem die produzierte Menge an IFN-γ im Überstand durch einen IFN-γ-spezifischen ELISA (siehe Abschnitt 2.3.2) detektiert wurde.

2.6.5 Peptidpräsentation durch humane dendritische Zellen

Um die Peptidpräsentation der humanen DC-Subtypen zu untersuchen, wurde den Kulturen, bei gleichen Bedingungen wie in Abschnitt 2.6.4, statt des löslichen oder zellassozierten Antigens 1 µg/ml des pp65₄₉₅₋₅₀₃ Peptids zugegeben.

2.7 Flt3 Ligand Behandlung von Mäusen

Um den Einfluss des Wachstumsfaktors Flt3 Ligand auf die Entwicklung von DC-Subtypen zu untersuchen, wurden Mäusen 1×10^6 Flt3L-sekretierende B16 Zellen (Abschnitt 2.4.1) in 100 μ l PBS subkutan (s.k.) injiziert. Splenozyten der Tiere wurden 9 Tage nach Behandlung mittels Durchflusszytometrie untersucht. Die Behandlung der Tiere wurde im Rahmen von anderen Experimenten mit E. Hartung und S. Güttler durchgeführt.

2.8 Statistik

Statistische Analysen wurden mit der Prism Software (GraphPad Software Inc., San Diego, USA) durchgeführt. In den dargestellten Graphen stellt jedes Symbol ein Tier bzw. eine humane Blutprobe dar. Angegeben ist der Median für alle zugehörigen Tiere bzw. Blutproben einer Gruppe sowie gegebenenfalls die Signifikanzen. Die Berechnung der Signifikanz der Unterschiede zwischen zwei Gruppen erfolgte mit dem t-Test; die Signifikanz wurde als * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Phänotypisierung XCR1-exprimierender Zellen der murinen Milz

Die Expression des Chemokinrezeptors XCR1 konnte vor Beginn dieser Arbeit durch zwei Methoden indirekt nachgewiesen werden: durch eine qRT-PCR spezifisch für XCR1-mRNA und eine B6.XCR1:lacZ Reportermaus, die β -Galaktosidase unter Kontrolle des XCR1-Promotor exprimiert (Dorner *et al.*, 2009). Dadurch war bekannt, dass CD8⁺ DC und ein kleiner Prozentsatz der DN DC der Milz XCR1 exprimieren. Eine direkte durchflusszytometrische Oberflächenfärbung des Chemokinrezeptors XCR1 war nicht möglich.

3.1.1 Der Chemokinrezeptor XCR1 wird spezifisch auf der Zelloberfläche von CD8⁺ und DN konventionellen dendritischen Zellen exprimiert

Es sollte erstmalig die Expression des Chemokinrezeptors XCR1 auf der Oberfläche von murinen Zellen nachgewiesen werden. Dazu wurden Splenozyten von C57BL/6 sowie XCR1-defizienten B6.XCR1:lacZ Mäusen, mit dem von E. Hartung generierten anti-XCR1 mAκ (Klon: MARX10), durchflusszytometrisch analysiert. Bei der Auswertung wurden CD11c⁺MHCII⁺Lin⁻ (Lin: CD3, CD45R, Ly6G/C) Zellen als cDC, CD317⁺CD45R⁺ Zellen mit einem mittleren Niveau der CD11c-Expression (CD11c^{mi}) als pDC definiert.

Der mAκ MARX10 detektierte spezifisch 20 % (± 4 % StdAbw, n=22) der cDC aus Milzen von C57BL/6 Mäusen, während die Färbung von B6.XCR1:lacZ Splenozyten kein Signal ergab (Abb. 5 A). Plasmazytoide DC zeigten keine XCR1-Expression auf der Zelloberfläche (Abb. 5 B). Konventionelle DC können in CD8⁺ und CD8⁻ DC unterteilt werden, wobei die CD8⁻ DC weiter in CD4⁺ und DN DC gegliedert werden können (Vremec *et al.*, 2000). Von den CD8⁺ DC exprimierten 83 % (± 6 % StdAbw, n=22) XCR1 auf der Oberfläche, während die restlichen CD8⁺ DC negativ für XCR1 waren (Abb. 5 C). CD4⁺ DC exprimierten kein XCR1, wohingegen 4 % (± 1.8 % StdAbw, n=19) der DN DC XCR1 auf der Zelloberfläche trugen (Abb. 5 C). Die XCR1-Färbung von einem Großteil der CD8⁺ DC und wenigen DN DC wurde ebenfalls bei BALB/c sowie 129/Sv Mausstämmen festgestellt (nicht gezeigt bzw. Abb. 11). Die Daten, die mit dem mAκ MARX10 generiert wurden, konnten mit zwei unabhängigen Methoden bestätigt werden: Einerseits über eine Färbung mit dem Liganden XCL1, der an Fluorophore gekoppelt wurde (nicht gezeigt). Andererseits durch eine Kofärbung von Splenozyten heterozygoter B6.XCR1:lacZ Reportermäuse mit dem mAκ

MARX10 und dem β -Galaktosidase-Substrat FDG (nicht gezeigt). Die lacZ-Reportermäuse exprimieren anstatt XCR1 β -Galaktosidase, welche das FDG zu Fluorescein hydrolysiert, welches wiederum in der Durchflusszytometrie detektiert werden kann.

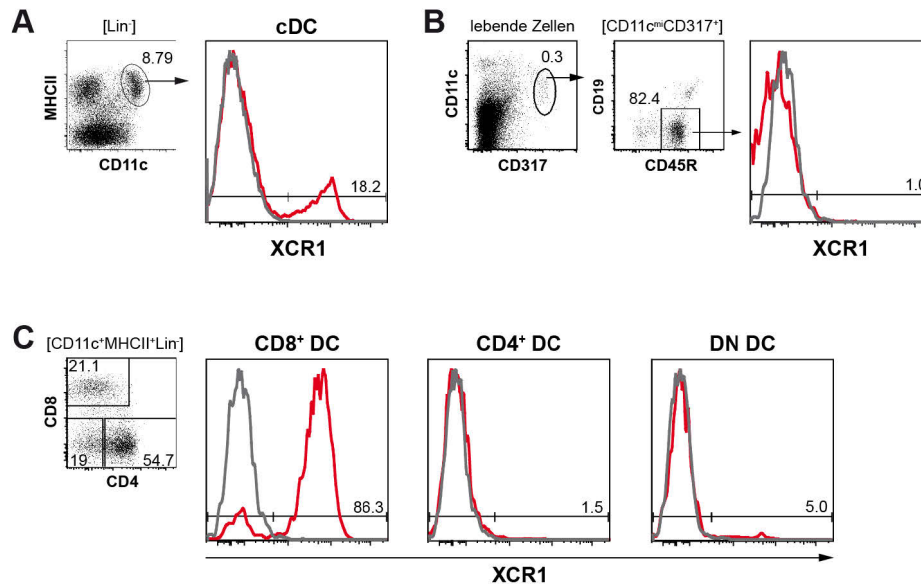


Abb. 5 **CD8⁺ und DN konventionelle dendritische Zellen der Milz exprimieren den Chemokinrezeptor XCR1**

Dendritische Zellen (DC) von C57BL/6 (rote Linien) und B6.XCR1:lacZ (graue Linien) Mäusen wurden mithilfe des anti-XCR1 monoklonalen Antikörpers (mAk) MARX10 auf ihre XCR1-Expression hin untersucht. (A) CD11c⁺MHCII⁺Lin⁻ Zellen wurden als konventionellen DC (cDC) definiert (Plot). Durchflusszytometrische Färbung von XCR1 auf der Zelloberfläche von cDC (Histogramm). (B) Eingrenzung plasmazytoider DC (pDC) als CD11c^{mi}CD317⁺CD45R⁺ Zellen (Plots). Durchflusszytometrische Färbung von XCR1 auf pDC (Histogramm). (C) Eingrenzung (Plot) und XCR1-Signal (Histogramme) der cDC-Subtypen, aufgeteilt in CD8⁺, CD4⁺ und DN DC.

Um die selektive XCR1-Färbung der CD8⁺ und DN DC zu bestätigen, wurden neben DC auch andere Zellpopulationen der Milz auf ihre XCR1-Expression hin durchflusszytometrisch untersucht. Keine der analysierten Zellpopulationen, unter diesen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen und Makrophagen zeigten ein XCR1-Signal (Abb. 6). Auch $\gamma\delta$ T-Zellen, NKT-Zellen und Granulozyten waren XCR1-negativ (nicht gezeigt).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass der Chemokinrezeptor XCR1 spezifisch auf 83 % der CD8⁺ DC und 4 % der DN DC der Splenozyten exprimiert wird.

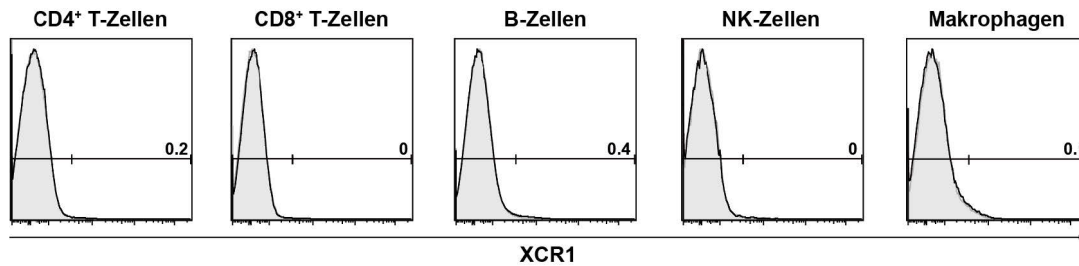


Abb. 6 T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen und Makrophagen der Milz exprimieren kein XCR1

Diverse Zellpopulationen der Milz von C57BL/6 (schwarze Linie) und B6.XCR1:lacZ (ausgefüllte graue Histogramme) Mäusen wurden auf ihre Oberflächenexpression von XCR1 untersucht. Dazu wurde der mAk MARX10 verwendet. Gezeigt sind Histogramme von CD4⁺ T-Zellen (CD19⁻CD3⁺CD4⁺), CD8⁺ T-Zellen (CD19⁻CD3⁺CD8⁺), B-Zellen (CD3⁻MHCII⁺CD19⁺), NK-Zellen (CD3⁻NK1.1⁺) sowie Makrophagen (F4/80⁺CD11b⁺).

3.1.2 Die Expression von XCR1 auf dendritischen Zellen korreliert mit CD8, CD205 sowie Clec9A und anti-korreliert mit CD172a und CD11b

Neben CD4 und CD8 werden weitere Oberflächenmoleküle für die Abgrenzung von DC-Subtypen verwendet (Shortman und Heath, 2010). Da die Expression von XCR1 sich nicht in die klassische Unterteilung über CD4 und CD8 einordnen ließ, wurden verschiedene Oberflächenrezeptoren auf cDC der Milz mit XCR1 korreliert. Für die Analyse der Rezeptoren CD207 (Langerin) und CX3CR1 (*fraktalkine* Rezeptor) wurden GFP-Reportermäuse verwendet (siehe Tab. 2). Diese Tiere exprimieren GFP unter Kontrolle des CD207- bzw. CX3CR1-Promotors, wodurch deren Expression durchflusszytometrisch detektiert werden kann. Alle anderen Rezeptoren wurden mit spezifischen mAk angefärbt.

Die Expression der Moleküle CD8, CD205, Clec9A, CD103 und CD207 korrelierte positiv mit XCR1, jedoch in keinem Fall zu 100 % (Abb. 7, obere Reihe). Die Korrelation von XCR1 mit CD205 und Clec9A war am stärksten ausgeprägt, mit einer Überlappung von über 90 %. Die Moleküle CD103 und CD207 korrelierten weniger stark mit XCR1. In beiden Fällen waren ca. 25 % der XCR1-positiven Zellen negativ für die beiden Rezeptoren. Auch die Expression von CD24 und CD86 korrelierte positiv mit XCR1, wiederum jedoch nicht vollständig (nicht gezeigt). Die Rezeptoren CD4, CD172a (SIRPα), CD11b, CX3CR1 sowie DCIR2 anti-korrelierten mit der XCR1-Expression auf cDC (Abb. 7, untere Reihe). Am stärksten anti-korrelierte die Expression von XCR1 mit CD172a. Auffällig war, dass Rezeptoren, die in der Literatur mit der Kreuzpräsentation von DC-Subtypen in Verbindung gebracht werden (z.B. CD8, CD103 und CD205), sehr gut mit XCR1 korrelierten.

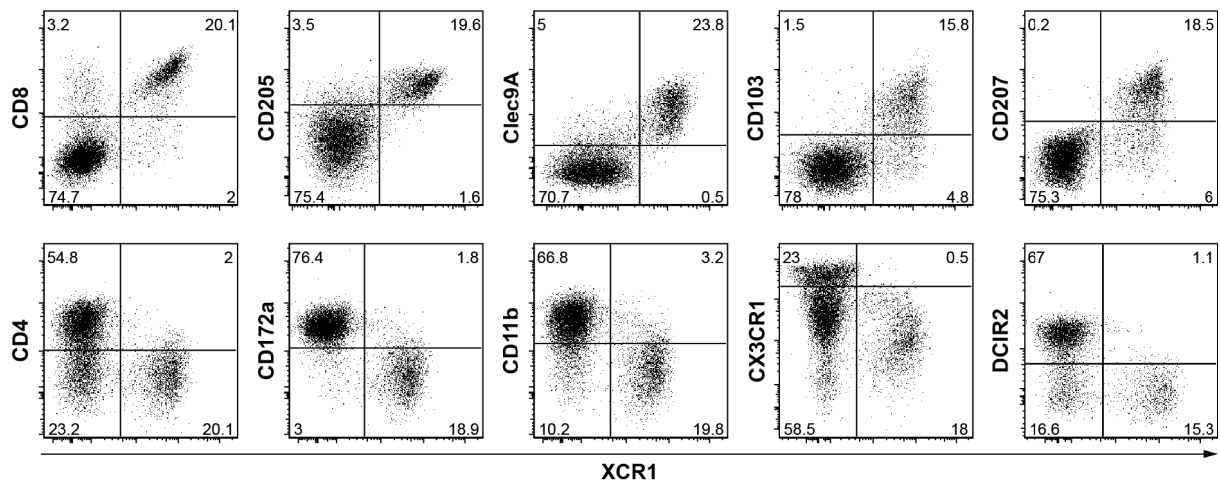


Abb. 7 Die Expression von XCR1 auf dendritischen Zellen der Milz korreliert mit CD8, CD205 sowie Clec9A und anti-korreliert mit CD172a und CD11b

Konventionelle Dendritische Zellen (cDC) von C57BL/6, CD207:GFP, CX3CR1:GFP und B6.XCR1:lacZ Mäusen wurden durch Verdau und Dichtegradientenzentrifugation angereichert. Sie wurden als CD11c⁺MHCII⁺Lin⁻ Zellen definiert und mit DC-assoziierten Rezeptoren und dem mAk MARX10 (anti-XCR1) gefärbt und in der Durchflusszytometrie analysiert. Für die Clec9A-Färbung wurde der Klon 24/04-10B4 eingesetzt, ähnliche Ergebnisse wurden mit dem Klon 1F6 erzielt. Die Eingrenzungen der Zellen wurde anhand des XCR1-Signals der B6.XCR1:lacZ Mäuse gesetzt, deren Zellen kein XCR1 exprimieren.

3.1.3 Der Phänotyp der XCR1⁺ dendritischen Zellen ist relativ homogen unabhängig von ihrer CD8-Expression

Der Korezeptor CD8 wurde als erster zur Unterteilung der DC eingeführt (Nussenzweig *et al.*, 1981). Durch die funktionelle Abgrenzung der CD8⁺ DC von den anderen DC-Subtypen, wie z.B. durch die IL-12p70 Sekretion oder die Kreuzpräsentation, wird CD8 bis heute verwendet (Shortman und Heath, 2010). Es gibt aber erste Hinweise, dass die CD8⁺ Population nicht homogen ist und ein Teil der CD8⁻ DC die gleichen Funktionen ausüben kann (Vremec *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2008; Farrand *et al.*, 2009; Qiu *et al.*, 2009; Bedoui *et al.*, 2009a; Bar-On *et al.*, 2010). Wegen der stark ausgeprägten, aber nicht 100 %igen, Korrelation von XCR1 mit CD8 wurden im Folgenden die XCR1⁺ DC in XCR1⁺CD8⁺, XCR1⁺CD8⁻ DC unterteilt und mit den XCR1⁻CD8⁺ sowie XCR1⁻CD8⁻ DC bezüglich ihres Phänotyps verglichen. Dazu wurde die Expression einer Auswahl an DC-assoziierten Rezeptoren durchflusszytometrisch analysiert. Wie in Kap. 3.1.2, wurde die Detektion der Moleküle CD207 und CX3CR1 anhand von GFP-Reportermäusen ermöglicht.

Vergleicht man die Expression der getesteten Oberflächenmoleküle auf den XCR1⁺CD8⁺ und XCR1⁺CD8⁻ DC fällt auf, dass CD205, CD86, Clec9A und CD24 von beiden XCR1⁺ DC-Populationen stark exprimiert wurden (Abb. 8). CD172a, CD4, DCIR2, CD11b und CX3CR1 wurden hingegen von beiden XCR1⁺ Populationen nur schwach exprimiert. Lediglich in der Expression der Rezeptoren CD103 und CD207 unterschieden sich die XCR1⁺CD8⁺ und

XCR1⁺CD8⁻ DC: die XCR1⁺CD8⁺ DC exprimierten mehr von beiden Molekülen auf der Oberfläche.

CD8⁺ DC, die kein XCR1 auf der Oberfläche trugen (XCR1⁻CD8⁺ DC), zeigten ein ausgesprochen abweichendes Expressionsmuster der untersuchten Rezeptoren. Lediglich die Expression von CD24, CD11b sowie DCIR2 war ähnlich ausgeprägt wie bei den XCR1⁺ Zellen. XCR1⁻CD8⁻ DC, die größte Population der DC, überschritten sich weitgehend im Expressionsmuster mit den XCR1⁻CD8⁺ DC; beide Populationen exprimierten wenig bis kein CD205, CD86, Clec9A, CD103 und CD207, dafür aber vermehrt CD172a. In der Expression von CD24, DCIR2 und CD11b unterschieden sie sich deutlich voneinander.

Zusammenfassend kann man sagen, dass sich die XCR1⁺CD8⁺ und XCR1⁺CD8⁻ DC-Populationen in der Expression der untersuchten Rezeptoren, mit Ausnahme der Oberflächenmoleküle CD103 und CD207, stark ähneln. Da bekannt ist, dass die Expression von CD103 während der Reifung von Zellen zunimmt (Zhan *et al.*, 2011), kann man spekulieren, dass es sich bei den XCR1⁺CD8⁻ DC um Vorläuferzellen der XCR1⁺CD8⁺ DC handeln könnte. Die XCR1⁻ Populationen unterscheiden sich hingegen stark von den XCR1⁺ Populationen.

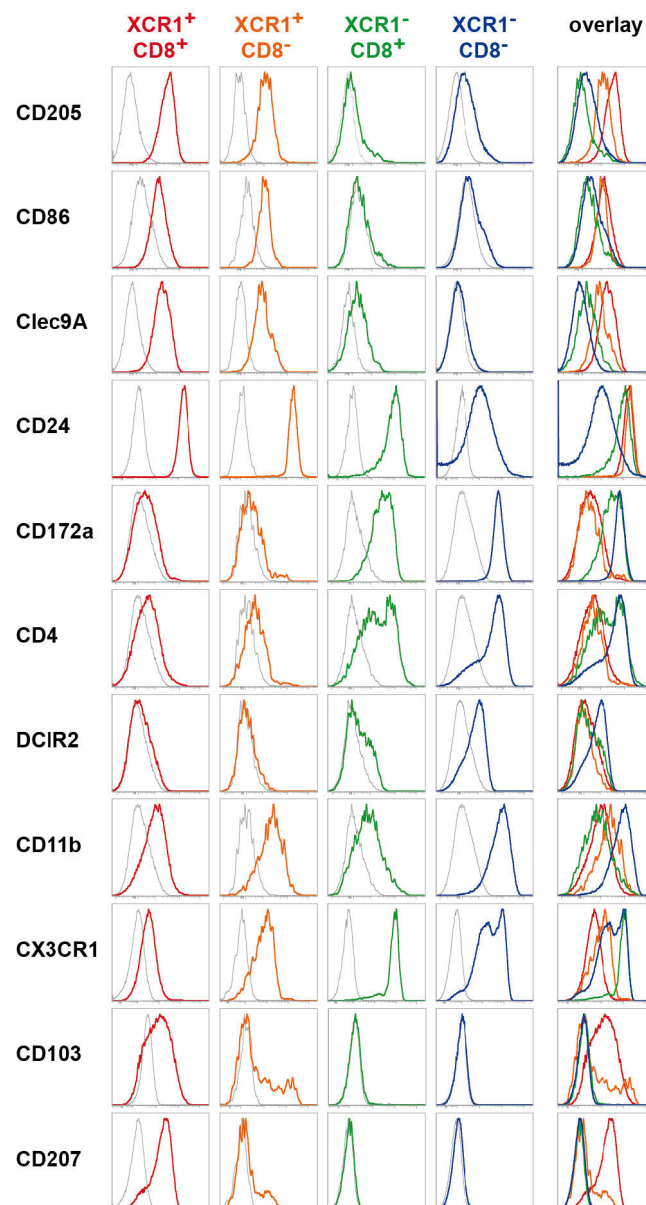


Abb. 8 Der Phänotyp $XCR1^+CD8^+$ und $XCR1^+CD8^-$ dendritischer Zellen ist vergleichsweise analog und abweichend von $XCR1^-$ dendritischen Zellen

Dendritische Zellen (DC) von C57BL/6, CD207:GFP und CX3CR1:GFP Mäusen wurden durch Verdau und Dichtegradientenzentrifugation angereichert und durchflusszytometrisch untersucht. Dargestellt sind Histogramme der Expression diverser DC-Rezeptoren, wobei $XCR1^+CD8^+$ (rot), $XCR1^+CD8^-$ (orange), $XCR1^-CD8^+$ (grün) und $XCR1^-CD8^-$ (blau) DC eingegrenzt wurden. Für die Clec9A-Färbung wurde der Klon 24/04-10B4 verwendet. Als Hintergrund-Signal wurden die entsprechenden Isotypen oder Fluoreszenz-minus-eins (FMO) Kontrollen verwendet (grau). $CD11c^+MHCII^+Lin^-$ Zellen wurden als DC definiert.

3.2 Die Entwicklung $XCR1$ -positiver dendritischer Zellen der Milz

Es sollte erstmalig analysiert werden, zu welchem Zeitpunkt der Ontogenese $XCR1$ -positive DC detektierbar sind und wie sich deren Phänotyp während der Entwicklung verändert. Weiterhin sollte der Einfluss des Wachstumsfaktors Flt3 Ligand und der TF Batf3 und IRF-8 auf die Entstehung der $XCR1^+$ DC untersucht werden.

3.2.1 Die XCR1-Expression dendritischer Zellen verändert sich einschneidend während der Ontogenese

Die Expression der Oberflächenmoleküle von DC, wie sie im vorigen Abschnitt analysiert wurde, verändert sich stark während der Ontogenese. Die Einteilung der cDC in CD8⁺, CD4⁺ und DN DC kann in jungen Mäusen nicht vorgenommen werden, da z.B. CD8 noch nicht bei der Geburt der Tiere exprimiert wird (Dakic *et al.*, 2004). Daher wurde die Expression von XCR1 (analysiert mit dem mAk MARX10) auf DC unterschiedlich alter Tiere der Expression von CD8, CD103 und CD205 gegenübergestellt. Hierzu wurden Milzen von bis zu acht Wochen alten C57BL/6 Mäusen durchflusszytometrisch analysiert. CD11c⁺CD3⁻B220⁻ Zellen wurden in diesen Experimenten als konventionelle DC definiert (Abb. 9 A). MHC II wurde nicht als Kriterium verwendet, da es relativ spät in der Entwicklung der DC hochreguliert wird (Dakic *et al.*, 2004).

Der Anteil von cDC an lebenden Splenozyten lag während der ersten zwei Wochen nach der Geburt der Mäuse bei 0,25 - 0,3 % (Abb. 9 B). Nach zwei Wochen stieg er auf 1,2 % an und blieb daraufhin relativ konstant. Die XCR1⁺ DC stellten zu allen analysierten Zeitpunkten 0,1 - 0,2 % der gesamten lebenden Splenozyten dar. Im Kontrast zu den Gesamt-DC stieg ihre Frequenz nicht nach der zweiten Woche.

Die absolute Zellzahl der cDC von Tieren im Alter von einem Tag belief sich auf ca. $0,3 \times 10^4$ Zellen/Milz und stieg bis zu einem Alter von zwei Wochen langsam an (Abb. 9 C). Innerhalb der darauffolgenden zwei Wochen erreichten die cDC eine konstante Anzahl von 80×10^4 Zellen/Milz. Insgesamt stieg damit die Anzahl der cDC innerhalb der untersuchten acht Wochen um das 260-fache an. Die XCR1⁺ DC stellten mit $0,1 \times 10^4$ Zellen/Milz einen Tag nach der Geburt der Tiere einen vergleichsweise großen Anteil der cDC dar (> 35 %). Ihre Anzahl erhöhte sich im Vergleich zu den Gesamt-DC nur schwach und erreichte das Maximum bei einem Alter der Tiere von vier Wochen mit 12×10^4 Zellen/Milz. Die Entwicklung der XCR1⁺ DC schien damit einer anderen Kinetik zu folgen als die der XCR1⁻ DC.

Die Expression von XCR1 änderte sich drastisch innerhalb der ersten Lebenswochen der Tiere (Abb. 9 D). Um die 35 % der cDC der einen Tag alten Mäuse exprimierten bereits XCR1. Damit wurde XCR1 vor und völlig unabhängig von CD8 exprimiert; dessen Expression wurde erst innerhalb der ersten Woche nach der Geburt detektiert. Nach zwei Wochen sank die Frequenz der XCR1⁺ DC auf 15 - 20 % der cDC ab und hielt sich bei diesem Anteil bis zum Alter von acht Wochen der Mäuse. Die Korrelation von XCR1 zu dem Oberflächenmolekül CD8 steigerte sich innerhalb der ersten zwei Wochen und blieb dann

relativ stabil. Interessanterweise befanden sich zu frühen Zeitpunkten viele $\text{XCR1}^+\text{CD8}^-$ DC in der Milz, zu späteren Zeitpunkten viele $\text{XCR1}^+\text{CD8}^+$ DC (Abb. 9 D, obere Reihe); die $\text{XCR1}^+\text{CD8}^-$ DC nahmen gleichzeitig langsam ab. Dies ist, neben dem ähnlichen Phänotyp der beiden Populationen (siehe Kap. 3.1.3), ein weiterer Hinweis darauf, dass es eine Vorläuferbeziehung zwischen den $\text{XCR1}^+\text{CD8}^-$ und den $\text{XCR1}^+\text{CD8}^+$ DC zu geben scheint, wonach sich die $\text{XCR1}^+\text{CD8}^+$ DC aus den $\text{XCR1}^+\text{CD8}^-$ DC ableiten. Es wurde von Bedoui *et al.* (2009a) gezeigt, dass bei Transfer von $\text{CD8}^-\text{CD24}^+$ DC in Donormäuse, von diesen Zellen mit der Zeit CD8 hochreguliert wird. Diese $\text{CD8}^-\text{CD24}^+$ Vorläuferzellen spiegeln wahrscheinlich die $\text{XCR1}^+\text{CD8}^-$ wieder.

Die Expression der Moleküle XCR1 und CD103 korrelierte nur schwach einen Tag nach der Geburt der Tiere (Abb. 9 D, mittlere Reihe). Auch bei acht Wochen alten Tieren gab es keine besonders hohe Korrelation der beiden Moleküle. Der Rezeptor CD205 war auf einem Großteil der cDC neugeborener Tiere exprimiert, seine Expression änderte sich aber stark innerhalb der ersten Wochen nach der Geburt (Abb. 9 D, untere Reihe). Somit korrelierte die Expression von CD205 mit XCR1 bei ausgewachsenen Tieren stark, vor einem Alter von acht Wochen aber kaum. Zu keinem Analysezeitpunkt korrelierte XCR1 mit CD8, CD103 oder CD205 zu 100 %. Neben den dargestellten Molekülen wurde zudem die Expression von CD4, CD24 und MHC II analysiert. XCR1 und CD4 korrelierten nicht in ihrer Expression; CD24 war auf einem Großteil der cDC exprimiert (nicht gezeigt). Im Kontrast zu Angaben in der Literatur konnte MHC II schon bei neugeborenen Mäusen detektiert werden (nicht gezeigt).

Die Expression von XCR1 auf cDC ist somit während der Entwicklung der Tiere unabhängig von der Expression der anderen untersuchten Oberflächenmolekülen.

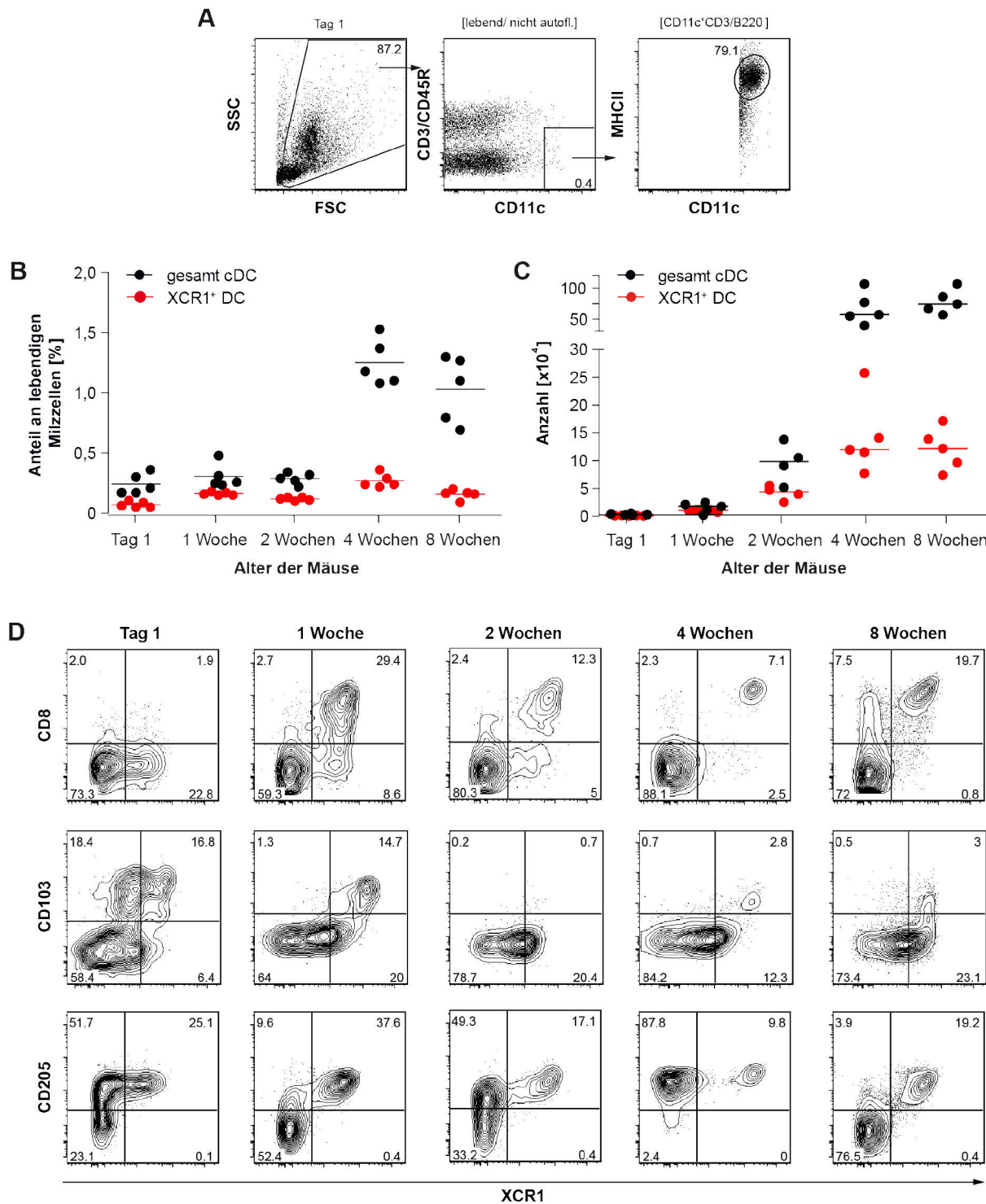


Abb. 9 Die Frequenz, Anzahl und der Phänotyp XCR1-positiver dendritischer Zellen der Milz während der Ontogenese

Splenozyten wurden aus C57BL/6 Tieren isoliert und $CD11^+CD3^+B220^-$ Zellen als konventionelle dendritische Zellen (cDC) in der Durchflusszytometrie definiert. (A) Eingrenzungsschema für cDC junger Mäuse. (B, C) Der Anteil (B) und die Anzahl (C) der Gesamt-cDC und $XCR1^+$ DC in unterschiedlichem Alter der Tiere. Dargestellt sind Einzeltiere sowie der Median. (D) Die Oberflächenmoleküle CD8, CD103 und CD205 sowie XCR1 wurden gefärbt. Die Zellen wurden wie in A abgebildet eingegrenzt; der monoklonale Antikörper MARX10 wurde zur Detektion des XCR1-Rezeptors verwendet.

3.2.2 Der Wachstumsfaktors Flt3 Ligand vermehrt selektiv XCR1-positive dendritische Zellen

Maraskovsky *et al.* (1996) zeigten, dass der Wachstumsfaktor Flt3 Ligand zu einer starken Vermehrung der CD8⁺ DC der Milz führt. Innerhalb dieser Versuchsreihe sollte der Einfluss des Flt3 Liganden speziell auf die Entwicklung der XCR1⁺ DC analysiert werden. Dazu wurde C57BL/6 Mäusen eine B16 Zelllinie s.k. injiziert, die kontinuierlich Flt3 Ligand sezerniert. Nach neun Tagen wurden die Milzen der behandelten Mäuse entnommen und durchflusszytometrisch analysiert.

Der Anteil der XCR1⁺ DC an den Gesamt-DC unbehandelter C57BL/6 Mäuse belief sich auf 20 % (± 4 % StdAbw, n=4) (Abb. 10 A, linker Plot). Nach Behandlung mit dem Flt3 Liganden erhöhte sich der Anteil der XCR1⁺ DC an Gesamt-DC auf 43,6 % ($\pm 10,5$ % StdAbw, n=4) (Abb. 12 A, rechter Plot). Die XCR1⁺ DC wurden damit die frequenzstärkste Population innerhalb der DC der Milz. Wenn die XCR1⁺ DC nach ihrer CD8-Expression untergliedert wurden, nahm sowohl die Frequenz der XCR1⁺CD8⁺ als auch der XCR1⁺CD8⁻ DC stark zu. Der Anteil der XCR1⁺CD8⁺ DC erhöhte sich um das 20-fache, während der der XCR1⁺CD8⁻ DC um das 25-fache zunahm (Abb. 10 B). Die beiden XCR1⁻ Populationen (XCR1⁻CD8⁺ und XCR1⁻CD8⁻ DC) nahmen hingegen nur leicht zu (≤ 6 -fach). Vor allem ist anzumerken, dass der Anteil der CD8⁺ DC, die kein XCR1 exprimierten, vergleichsweise gering anstieg.

Es konnte also erstmals demonstriert werden, dass sich der Wachstumsfaktor Flt3 Ligand selektiv auf die Entwicklung der XCR1⁺ DC auswirkt.

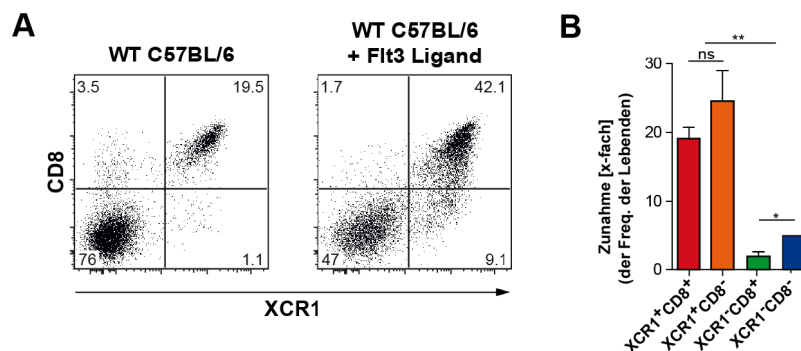


Abb. 10 XCR1-positive dendritische Zellen der Milz sind stark vermehrt nach Behandlung mit Flt3 Ligand

C57BL/6 Mäusen wurden 1×10^6 B16-Zellen s.k. injiziert, die kontinuierlich Flt3 Ligand sekretieren. Nach 9 Tagen wurden die Milzen der Tiere entnommen und die Zusammensetzung der dendritischen Zellen (DC) durchflusszytometrisch untersucht. CD11c⁺MHCII⁺Lin⁻-Zellen wurden als DC definiert und anhand ihrer XCR1- und CD8-Expression unterschieden. (A) Plot von DC unbehandelter C57BL/6 Mäuse (links) sowie mit Flt3 Ligand behandelte C57BL/6 Mäuse (rechts). (B) Zunahme der Anteile der XCR1⁺CD8⁺, XCR1⁺CD8⁻, XCR1⁻CD8⁺ und XCR1⁻CD8⁻ DC-Subtypen an den gesamten lebenden Splenozyten (Mittelwert \pm StdAbw aus 4 Experimenten mit je 10 Tieren; ns: nicht signifikant; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$).

3.2.3 Die Entwicklung XCR1-positiver dendritischer Zellen ist abhängig von den Transkriptionsfaktoren Batf3 und IRF-8

Mäuse, die defizient für die TF Batf3 oder IRF-8 sind, haben eine stark reduzierte CD8⁺ DC Population (Holtschke *et al.*, 1996; Hildner *et al.*, 2008). Inwieweit diese beiden TF für die Entwicklung der XCR1⁺ DC notwendig sind, war vor Beginn dieser Arbeit nicht bekannt. Milzen von *Batf3*- und *Irf8*-defizienten Mäusen wurden entnommen und die XCR1-Expression der cDC durchflusszytometrisch mit dem mAk MARX10 analysiert. Da beide Mausstämmen auf dem 129/Sv Hintergrund generiert wurden, wurden Milzen von 129/Sv WT Mäusen als Kontrollen verwendet.

Der Anteil der XCR1⁺ DC an Splenozyten von 129/Sv WT Mäusen betrug 12 % (± 2 % StdAbw, n=4). Diese Zellen konnten sowohl in *Batf3*- als auch *Irf8*-defizienten Tieren nicht detektiert werden (Abb. 11 A). In beiden Mausstämmen wurde jedoch ein geringer Anteil der CD8⁺ DC erfasst. Diese Zellen exprimierten kein XCR1 (XCR1⁻CD8⁺) und wurden weiterhin auf die Expression der Rezeptoren CD205, CD103 und CD4 untersucht. Es wurden keine Unterschiede zwischen den XCR1⁻CD8⁺ DC von 129/Sv WT Mäusen und *Batf3*-defizienten Mäusen entdeckt (Abb. 11 B).

Aufgrund dieser Ergebnisse kann man theoretisch nicht unterscheiden, ob die XCR1⁺ DC in *Batf3*- und *Irf8*-defizienten Mausstämmen fehlen oder ob lediglich die Expression des Moleküls XCR1 unterdrückt wird. Durch die zusätzlichen Informationen, dass weitere Moleküle, wie CD8, CD103 und CD205, nur in geringem Maße auf DC dieser Tiere detektiert werden können und die DC dieser Tiere nicht zur Kreuzpräsentation fähig sind (Hildner *et al.*, 2008), ist es wahrscheinlich, dass die Population der XCR1⁺ DC nicht vorhanden ist.

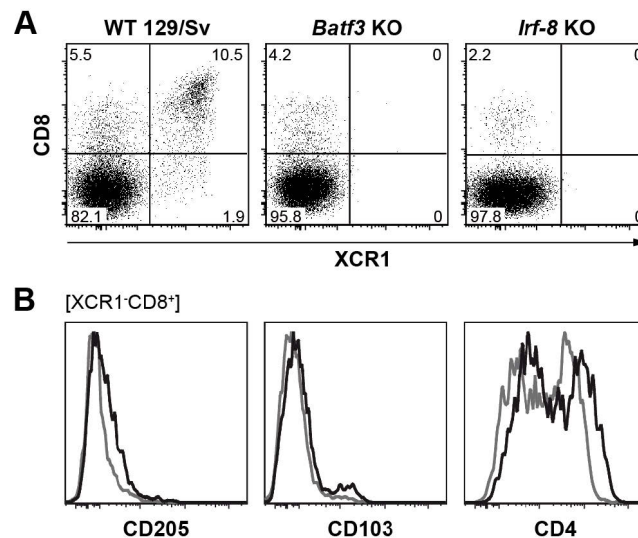


Abb. 11 In *Batf3*- und *Irf-8*-defizienten Mäusen sind keine XCR1-positiven dendritischen Zellen in der Milz detektierbar

Milzen von 129/Sv WT, *Batf3*- und *Irf-8*-defizienten Mäusen wurden auf ihre XCR1-Expression hin untersucht. (A) Gezeigt sind repräsentative durchflusszytometrische Plots; eingegrenzt sind cDC ($CD11^+MHCII^+Lin^-$) und ihre XCR1- und CD8-Expression ist dargestellt. (B) Histogramme der Expression von CD205, CD103 und CD4 der $XCR1^+CD8^+$ DC von 129/Sv WT (schwarz) und *Batf3*-defizienten (grau) Tieren.

3.3 Untersuchung der Funktion XCR1-positiver dendritischer Zellen der Milz

Die DC des Immunsystems zeichnet ihre potente Aufnahme, Prozessierung und Präsentation von Antigenen an T-Zellen aus. Um die $XCR1^+$ DC funktionell zu charakterisieren, wurde deren Antigenaufnahme und -präsentation mit der anderer DC-Subtypen verglichen.

3.3.1 XCR1-positive dendritische Zellen nehmen effizient zellassoziertes Antigen auf

Bisher wurde die Expression von CD8 als Kriterium verwendet, um DC abzugrenzen, die effektiv Antigene aufnehmen können. Da ein Großteil (ca. 83 %) der $CD8^+$ DC $XCR1$ exprimiert, sollten die $CD8^+$ DC bei der Analyse der Antigenaufnahme anhand ihrer $XCR1$ -Expression unterteilt werden. Ein weiterer Fokus sollte auf die Antigenaufnahme der $XCR1$ -exprimierenden DN DC gelegt werden. Daraus ergaben sich die vier Gruppen $XCR1^+CD8^+$, $XCR1^+CD8^-$, $XCR1^-CD8^+$, und $XCR1^-CD8^-$ DC. C57BL/6 Mäusen wurden 10×10^6 CFSE-markierte Zellen der allogenen prä-B-Zelllinie 300-19- Δ OVA (OVA liegt intrazellulär vor; siehe Kap. 2.4.1) i.v. appliziert und deren Aufnahme durch cDC der Milz nach unterschiedlichen Zeitspannen durchflusszytometrisch betrachtet.

Von den durch cDC aufgenommenen 300-19-ΔOVA Zellen waren nach 2 h mehr als 80 % mit den XCR1⁺ DC assoziiert (Abb. 12 A). Hierbei konnten mit dem CFSE-Signal der injizierten Zellen 13 % aller XCR1⁺CD8⁺, 4 % der XCR1⁺CD8⁻, 0,4 % der XCR1⁻CD8⁺ und 0,2 % der XCR1⁻CD8⁻ DC assoziiert werden. Setzt man die Aufnahme der XCR1⁺CD8⁺ gleich 1 und setzt die Aufnahme der anderen DC-Gruppen in Bezug dazu, erhält man die Kapazität der Aufnahme pro Zelle. Diese entsprach einem Verhältnis von 65:20:2:1 (Abb. 12 B). Die Verteilung des CFSE-Signals blieb relativ konstant innerhalb der getesteten 24 h. Damit sind die XCR1⁺ DC, unabhängig von ihrer CD8-Expression, deutlich effektiver in der Aufnahme zellulären Antigens als XCR1⁻ DC.

Des Weiteren wurde die Aufnahme von löslichem OVA (OVA an Alexa647 gekoppelt) durch cDC getestet. Bei den analysierten Proben war ein hohes Alexa647-Signal in allen Zellpopulationen detektierbar (nicht gezeigt). Daher wurde davon ausgegangen, dass entweder das Alexa647 unspezifisch an alle möglichen Zellpopulationen bindet oder sehr viele Populationen zur Aufnahme von löslichem Protein befähigt sind.

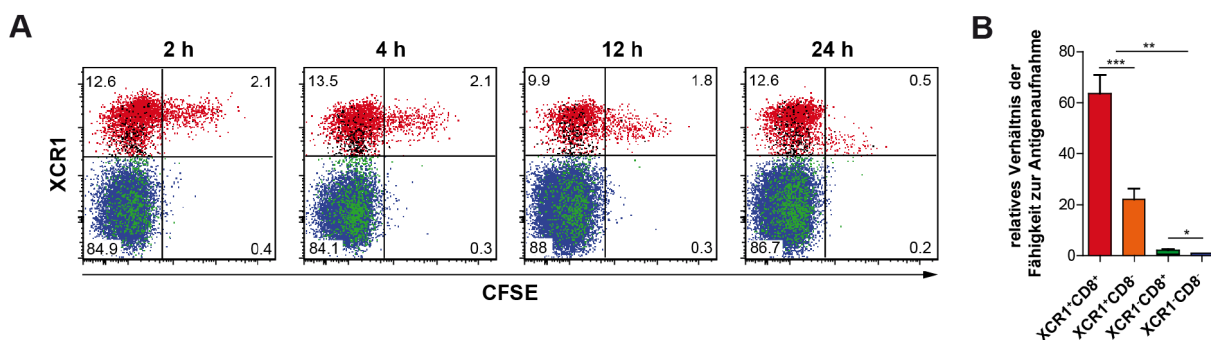


Abb. 12 XCR1-positive dendritische Zellen nehmen effizient zellassoziertes Antigen auf

C57BL/6 Mäusen wurden 10×10^6 CFSE-markierte 300-19-ΔOVA Zellen (OVA ausschließlich intrazellulär) i.v. injiziert. Deren Aufnahme durch dendritische Zellen (DC) wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchflusszytometrisch bestimmt. (A) Abgebildet sind cDC (CD11c⁺MHC II⁺Lin⁻). Die DC-Subtypen XCR1⁺CD8⁺ (rot), XCR1⁺CD8⁻ (schwarz), XCR1⁻CD8⁺ (grün) und XCR1⁻CD8⁻ (blau) sind farblich markiert. (B) Das relative Verhältnis der Fähigkeit zur Antigenaufnahme wurde berechnet, indem der Anteil der XCR1⁻CD8⁻ DC, die ein CFSE-Signal zeigten, gleich eins gesetzt wurde. Die Aufnahme der anderen DC-Subtypen wurde ins Verhältnis dazu gesetzt (Mittelwert \pm StdAbw aus zwei Versuchen mit je drei Tieren; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$).

3.3.2 Die Antigenpräsentation durch dendritische Zellsubtypen

3.3.2.1 Sortierung der XCR1⁺CD8⁺, XCR1⁺CD8⁻, XCR1⁻CD8⁺ und XCR1⁻CD8⁻ dendritischen Zellsubtypen

Um die Antigenpräsentation einzelner DC-Subtypen der Milz zu untersuchen, wurde eine Sortierungsstrategie für die Isolierung der XCR1⁺CD8⁺, XCR1⁺CD8⁻, XCR1⁻CD8⁺ und

XCR1⁺CD8⁻ DC-Subtypen etabliert. Durch die Oberflächenfärbung von XCR1 anhand des mAk MARX10 wurde erstmals eine Sortierung über XCR1 möglich.

Der Anteil der cDC von aufgereinigten Splenozyten beträgt ca. 1 %, der der aufgelisteten Subtypen zwischen 0,02 und 0,75 %. Deswegen mussten die cDC vor der durchflusszytometrischen Sortierung durch Verdau, DGZ und magnetische Sortierung angereichert werden (siehe Kap. 2.4.4.1 und 2.4.4.3). Dadurch wurde der Anteil der cDC an aufgereinigten Splenozyten auf ≥ 80 % erhöht. Die CD11c⁺MHC II⁺Lin⁻ Zellen wurden als cDC definiert und durchflusszytometrisch entsprechend ihrer XCR1- und CD8-Expression sortiert (Abb. 13 A). Die sortierten DC-Populationen (XCR1⁺CD8⁺, XCR1⁺CD8⁻, XCR1⁻CD8⁺ und XCR1⁻CD8⁻ DC) wiesen jeweils eine Reinheit von mehr als 98,5 % auf (Abb. 13 B).

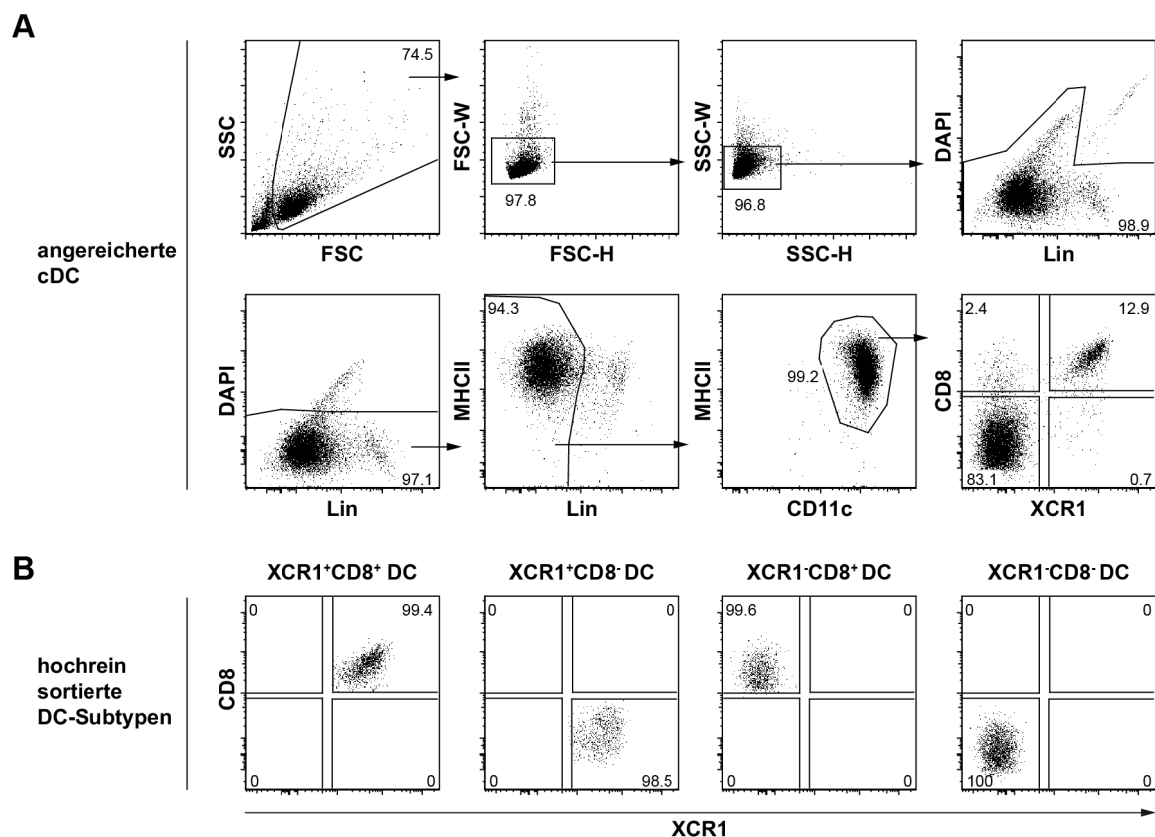


Abb. 13 Sortierungsstrategie der XCR1⁺CD8⁺, XCR1⁺CD8⁻, XCR1⁻CD8⁺ und XCR1⁻CD8⁻ dendritischen Zellsubtypen der Milz

(A) Konventionelle dendritische Zellen (cDC) der Milz wurden durch Verdau, Dichtegradientenzentrifugation und CD11c-magnetische Sortierung vorangereichert. Gezeigt ist die Eingrenzungs-Strategie für die durchflusszytometrische Sortierung der XCR1⁺CD8⁺, XCR1⁺CD8⁻, XCR1⁻CD8⁺ und XCR1⁻CD8⁻ DC sowie die Anteile der einzelnen Subtypen an den Gesamt-DC (rechter unterer Plot). (B) Reinheit der XCR1⁺CD8⁺, XCR1⁺CD8⁻, XCR1⁻CD8⁺ und XCR1⁻CD8⁻ DC-Populationen nach der durchflusszytometrischen Sortierung.

3.3.2.2 Die Peptidpräsentation durch $\text{XCR1}^+\text{CD8}^+$, $\text{XCR1}^+\text{CD8}^-$, $\text{XCR1}^-\text{CD8}^+$ und $\text{XCR1}^-\text{CD8}^-$ dendritische Zellen an CD4^+ sowie CD8^+ T-Zellen ist vergleichbar stark ausgeprägt

Peptide müssen von cDC nicht aufgenommen und prozessiert werden, sondern können direkt an die entsprechenden MHC Klasse I oder II Moleküle binden und CD8^+ oder CD4^+ T-Zellen präsentiert werden. Um die Fähigkeit dieser sogenannten „intrinsischen Präsentation“ von XCR1^+ DC mit denen anderer DC-Subtypen zu vergleichen, wurden DC, wie in Abschnitt 3.3.2.1, nach ihrer XCR1 - und CD8 -Expression sortiert. Die $\text{XCR1}^+\text{CD8}^+$, $\text{XCR1}^+\text{CD8}^-$, $\text{XCR1}^-\text{CD8}^+$ und $\text{XCR1}^-\text{CD8}^-$ DC wurden mit dem MHC Klasse II-restringierten $\text{OVA}_{323-339}$ -Peptid oder mit dem MHC Klasse I-restringierten $\text{OVA}_{257-264}$ -Peptid für 2 h beladen. Nach dreimaligem Waschen wurden die DC mit angereicherten CFSE-markierten CD4^+ OT-II (erkennen spezifisch MHC II: $\text{OVA}_{323-339}$) oder CD8^+ OT-I T-Zellen (erkennen spezifisch MHC I: $\text{OVA}_{257-264}$) für 60 h koinkubiert. Die Proliferation der T-Zellen wurde anhand ihres CFSE-Profiles durchflusszytometrisch bestimmt.

In allen Fällen zeigten etwa 80 % der CD4^+ T-Zellen eine Abnahme des CFSE-Signals, welches die Teilung der Zellen widerspiegelt (Abb. 14 A). Die CD8^+ T-Zellen konnten ebenfalls durch Stimulation mit DC, die mit dem $\text{OVA}_{257-264}$ -Peptid beladen waren, zur Proliferation gebracht werden (Abb. 14 B). Die Proliferation der CD4^+ und CD8^+ T-Zellen war unabhängig vom eingesetzten DC-Subtyp.

Es kann festgestellt werden, dass alle vier DC-Subtypen gleichermaßen in der Lage sind, nach externer Beladung mit Peptiden, sowohl CD4^+ als auch CD8^+ T-Zellen zur Proliferation anzuregen.

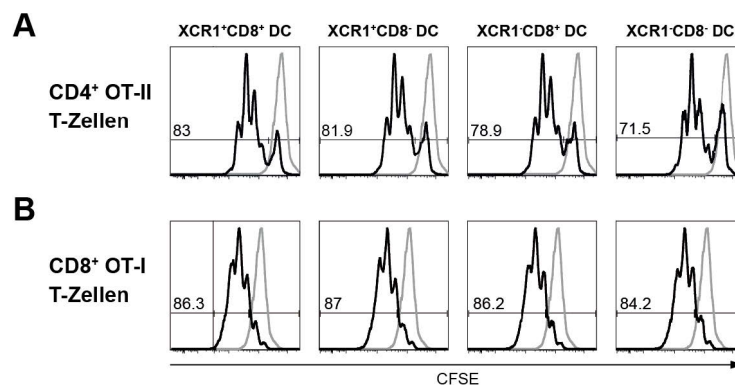


Abb. 14 Die Peptidpräsentation durch $\text{XCR1}^+\text{CD8}^+$, $\text{XCR1}^+\text{CD8}^-$, $\text{XCR1}^-\text{CD8}^+$ und $\text{XCR1}^-\text{CD8}^-$ dendritischen Zellen an CD4^+ und CD8^+ T-Zellen ist vergleichbar

Die konventionellen dendritischen Zellen (cDC) der Milz ($\text{CD11c}^+\text{MHC II}^+\text{Lin}^-$) von C57BL/6 Mäusen wurden durch Verdau, Dichtegradientenzentrifugation und CD11c -magnetische Sortierung angereichert. Die $\text{XCR1}^+\text{CD8}^+$, $\text{XCR1}^+\text{CD8}^-$, $\text{XCR1}^-\text{CD8}^+$ und $\text{XCR1}^-\text{CD8}^-$ DC-Subtypen wurden durchflusszytometrisch sortiert und mit $\text{OVA}_{323-339}$ - bzw. $\text{OVA}_{257-264}$ -Peptid für 2 h beladen. Die DC-Subtypen wurden gewaschen und 1×10^4 DC mit je 1×10^5 CFSE-markierten CD4^+ OT-II oder CD8^+ OT-I T-Zellen für 60 h koinkubiert. Gezeigt sind die Proliferationsprofile der CD4^+ OT-II (A) oder CD8^+ OT-I (B) T-Zellen mit den angegebenen DC-Subtypen (schwarz) im Vergleich zu unstimulierten T-Zellen (grau).

3.3.2.3 XCR1-positive dendritische Zellen kreuzpräsentieren effektiv lösliches und zellassoziertes Antigen

Bei der Kreuzpräsentation wird extrazelluläres Antigen in den MHC Klasse I Prozessierungsweg eingeschleust und CD8⁺ T-Zellen präsentiert (Bevan *et al.*, 1976a; 1976b). Vor allem die CD8⁺ DC sind dafür bekannt, effizient extrazelluläre Antigene an CD8⁺ T-Zellen zu präsentieren (den Haan *et al.*, 2000; Pooley *et al.*, 2001). Es wurde zudem publiziert, dass das Molekülpaar XCL1-XCR1 eine Rolle während der Interaktion zwischen DC und CD8⁺ T-Zellen spielt (Dorner *et al.*, 2009). Inwieweit sich die Kreuzpräsentation durch XCR1⁺ DC von der anderer DC-Subtypen unterscheidet, war vor Beginn dieser Arbeit nicht bekannt. Um diese Frage zu beantworten wurden C57BL/6 Mäusen 2 mg lösliches OVA oder 10x10⁶ 300-19-ΔOVA Zellen i.v. injiziert. Vierzehn Stunden später wurden die XCR1⁺CD8⁺, XCR1⁺CD8⁻, XCR1⁻CD8⁺ und XCR1⁻CD8⁻ DC-Subtypen der Milz, wie in Abschnitt 3.3.2.1, sortiert. Die Anzahl des eingesetzten DC-Subtyp wurde titriert (1 000 – 30 000) und diese mit je 1x10⁵ angereicherten CFSE-markierten CD8⁺ OT-I T-Zellen für 60 h koinkubiert. Die Abnahme des CFSE-Signals (CFSE^{nie}) wurde als Zeichen der Proliferation der CD8⁺ T-Zellen gewertet.

Bei Beladung mit löslichem OVA konnte, unabhängig vom eingesetzten DC-Subtyp, bei geringen Mengen an DC (1 000) kaum eine Proliferation der CD8⁺ T-Zellen festgestellt werden. Erst bei ansteigender Zahl an DC ($\geq 3\,000$) war ein deutlicher Unterschied in der Präsentationskapazität der einzelnen DC-Subtypen sichtbar (Abb. 15 A). Beide XCR1⁺ DC-Populationen (XCR1⁺CD8⁺ und XCR1⁺CD8⁻) stimulierten die CD8⁺ T-Zellen stärker als die XCR1⁻ Populationen (XCR1⁻CD8⁺ und XCR1⁻CD8⁻).

Während einer Infektion werden Zellen des Körpers durch direkte Infektion oder durch Abwehrmechanismen des Immunsystems getötet. Man nimmt an, dass diese Zellen zum Teil von DC aufgenommen und an zytotoxische T-Zellen präsentiert werden. Weiterhin spielt der Mechanismus der Antigenaufnahme und –präsentation von Zellen eine große Rolle in der Abwehr von Tumoren. Daher wurde zusätzlich die Kreuzpräsentation von zellassoziertem Antigen getestet. Nach Beladung mit zellassoziertem OVA waren die Unterschiede in der Präsentation zwischen den XCR1⁺ DC und XCR1⁻ DC wesentlich stärker ausgeprägt als bei Verwendung von löslichem Protein (Abb. 15 B). Ausschließlich die beiden XCR1⁺ Populationen (XCR1⁺CD8⁺ und XCR1⁺CD8⁻) präsentierten das zelluläre Antigen an CD8⁺ T-Zellen und stimulierten diese zur Proliferation. Beide XCR1⁻ DC-Populationen (XCR1⁻CD8⁺ und XCR1⁻CD8⁻) waren dazu nicht imstande.

Abgesehen von der Proliferation der CD8⁺ T-Zellen, wurde auch deren Expression der Aktivierungsmarker CD25, CD69, PD-1 und ICOS analysiert. Es konnten keine Unterschiede nach Inkubation mit den einzelnen DC-Subpopulationen festgestellt werden (nicht gezeigt). Auch die direkte Präsentation von Antigenen über MHC II an CD4⁺ T-Zellen wurde untersucht, wobei die Experimente analog durchgeführt wurden. Keine der eingesetzten DC-Populationen konnte die Proliferation der CD4⁺ T-Zellen stimulieren (nicht gezeigt).

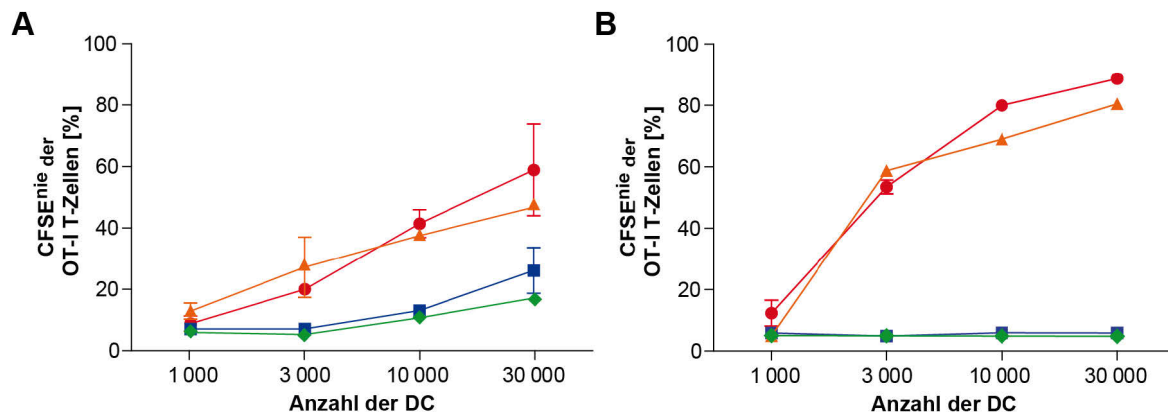


Abb. 15 XCR1-positive dendritische Zellen kreuzpräsentieren sowohl lösliches als auch zellassoziiertes Antigen stärker als XCR1-negative Zellen

C57BL/6 Mäusen wurde 2 mg lösliches OVA (A) oder 10×10^6 300-19-ΔOVA Zellen (B) i.v. injiziert. Dendritische Zellen der Milz (CD11c⁺MHC II⁺Lin⁻) wurden durch Verdau, Dichtegradientenzentrifugation und CD11c-magnetische Sortierung angereichert und durchflusszytometrisch anhand ihrer Expression von XCR1 und CD8 sortiert. Die DC-Subtypen XCR1⁺CD8⁺, XCR1⁺CD8⁻, XCR1⁻CD8⁺ und XCR1⁻CD8⁻ wurden mit CFSE-markierten CD8⁺ OT-I T-Zellen für 60 h kokultiviert. Dargestellt ist der Anteil der CFSE^{high} CD8⁺ T-Zellen nach Kokultur mit XCR1⁺CD8⁺ (rot), XCR1⁺CD8⁻ (orange), XCR1⁻CD8⁺ (grün) oder XCR1⁻CD8⁻ (blau) DC.

3.4 Bestimmung der XCR1-Expression des murinen Thymus, der Haut-dränierenden Lymphknoten sowie der Haut

Neben der Analyse der Expression von XCR1 auf Zellen der Milz, sollten auch Zellen anderer lymphatischer sowie nicht-lymphatischer Organen analysiert werden. Hierzu wurden Zellen des Thymus, der Haut-dränierenden LN und der Haut aufgearbeitet und untersucht. In Zusammenarbeit mit E. Hartung und S. Güttler wurden weiterhin die nicht-lymphatischen Organe Lunge und Darm sowie deren dränierende LN analysiert (nicht gezeigt).

3.4.1 CD8-positive dendritische Zellen des Thymus exprimieren XCR1

CD11c⁺MHC II⁺Lin⁻ Zellen des Thymus wurden als cDC definiert, wobei die zur Abgrenzung verwendeten populationsspezifischen mAk (Lin) B220 und CD90 enthielten. CD90 wird, im Gegensatz zu CD3, auf allen T-Zellen des Körpers exprimiert. Der Anteil der cDC an

Thymozyten ist relativ gering mit lediglich 0,05 - 0,5 %. Die cDC können in die zwei Subtypen CD8⁺ und CD172⁺ DC unterteilt werden (Shortman und Naik, 2007).

Einzelzellsuspensionen der Thymi von C57BL/6 und B6.XCR1:lacZ Mäusen wurden auf die Expression von XCR1 durchflusszytometrisch analysiert. Hierzu wurde XCR1 durch eine Färbung mit dem Liganden XCL1 detektiert. Dieser wurde vorher an Fluorophore gekoppelt (PE oder Alexa647). Über 50 % der CD8⁺ DC koexprimierten XCR1 auf der Zelloberfläche (Abb. 16). Von den CD172a⁺ DC waren weniger als 10 % positiv für XCR1. Keine andere Zellpopulation des Thymus exprimierte XCR1 (nicht gezeigt).

Damit zeigt sich auch im Thymus eine selektive Expression von XCR1 auf cDC sowie eine Korrelation mit dem Korezeptor CD8 und eine Anti-korrelation mit CD172a.

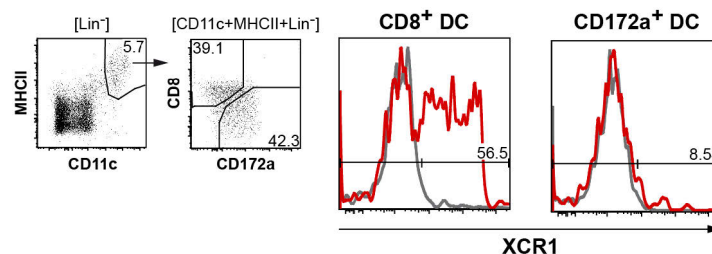


Abb. 16 XCR1 wird spezifisch auf einem Teil der CD8-positiven dendritischen Zellen des Thymus exprimiert

CD11c⁺MHC II⁺Lin⁻ (Lin: CD90, B220) Zellen der Thymi von C57BL/6 und B6.XCR1:lacZ Mäusen wurden als konventionelle dendritische Zellen (cDC) definiert und unterteilt in CD8⁺ und CD172a⁺ DC (Plots). Die XCR1-Expression der beiden DC-Populationen wurde durchflusszytometrisch mittels der Färbung über den Liganden analysiert. Die XCR1-Expression DC-Subtypen aus Thymi von C57BL/6 (rot) und B6.XCR1:lacZ (grau) Mäusen sind vergleichend dargestellt (Histogramme).

3.4.2 Die Expression von XCR1 korreliert mit CD103 auf migratorischen DC und mit CD8 sowie CD205 auf residenten DC Haut-dränierender Lymphknoten

Konventionelle DC Haut-dränierender LN werden in migratorische und residente DC untergliedert. Migratorische DC wandern fortwährend aus der Haut in die LN ein und haben ein erhöhtes Expressionsniveau von CCR7 und MHC II (Ohl *et al.*, 2004). Residente DC verbleiben in den LN und zeigen eine mittlere Expression von MHC II auf der Zelloberfläche. Die XCR1-Expression von Einzelzellsuspensionen der LN von C57BL/6 und B6.XCR1:lacZ Mäusen wurde über den Liganden XCL1 detektiert. Migratorische und residente DC wurden anhand ihrer MHC II-Expression unterschieden und deren XCR1 Expression ist in Abb. 17 dargestellt. Ca. 20 % der migratorischen (MHC II^{h0}) sowie der residenten (MHC II^{mi}) DC von C57BL/6 Mäusen zeigten ein XCR1-Signal. Die XCR1⁺ und XCR1⁻ DC der residenten DC ließen sich wesentlich besser voneinander abgrenzen.

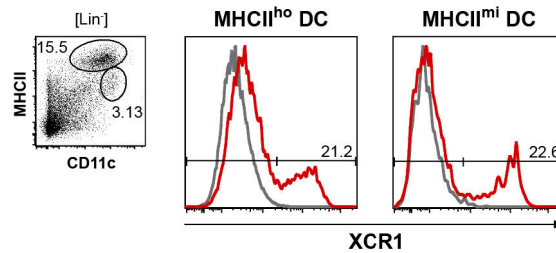


Abb. 17 Ein Teil der residenten und migratorischen dendritischen Zellen Haut-dränierender Lymphknoten exprimieren XCR1

CD11c⁺Lin⁻ Zellen Haut-dränierender Lymphknoten (inguinal, axillär, brachial) wurden als konventionelle dendritische Zellen definiert und anhand ihrer MHC II-Expression in migratorische (MHCII^{hi}) und residente (MHCII^{lo}) DC unterschieden (linker Plot). Die XCR1-Expression migratorischer und residenter DC aus C57BL/6 (rot) und B6.XCR1:lacZ (grau) Mäusen wurde durchflusszytometrisch mit dem Liganden XCL1 gefärbt (Histogramme).

Zur detaillierten Analyse der XCR1-Expression auf cDC der Haut-dränierenden LN wurde eine Vielzahl an DC-assoziierten Molekülen mit der XCR1-Expression korreliert. Die XCR1-Expression migratorischer (MHCII^{hi}) DC korrelierte ausschließlich mit CD103 in hohem Maße (Abb. 18, obere Reihe). Alle anderen getesteten Rezeptoren waren auch auf einem erheblichen Anteil XCR1-negativer DC exprimiert. Die XCR1⁺ DC exprimierten zusätzlich CD205, CD207 und CD326 (EpCAM). Die Expression des Integrins CD11b anti-korrelierte mit XCR1. Auf residenten DC (MHCII^{lo}) korrelierte XCR1 wesentlich stärker mit den analysierten Rezeptoren (Abb. 18, untere Reihe). Der Großteil der XCR1⁺ Zellen exprimierte CD8, wobei ein erheblicher Anteil der CD8⁺ DC kein XCR1 auf der Oberfläche trug. Der Rezeptor CD205 korrelierte stark mit XCR1. Die beiden Moleküle CD103 und CD207 waren auf ca. 65 % der XCR1-positiven DC exprimiert. Die Expression von CD4 antikorrelierte mit dem XCR1-Signal. Die residenten (MHCII^{lo}) DC der Haut-dränierenden LN zeigen damit einen ähnlichen Phänotyp wie die residenten DC der Milz.

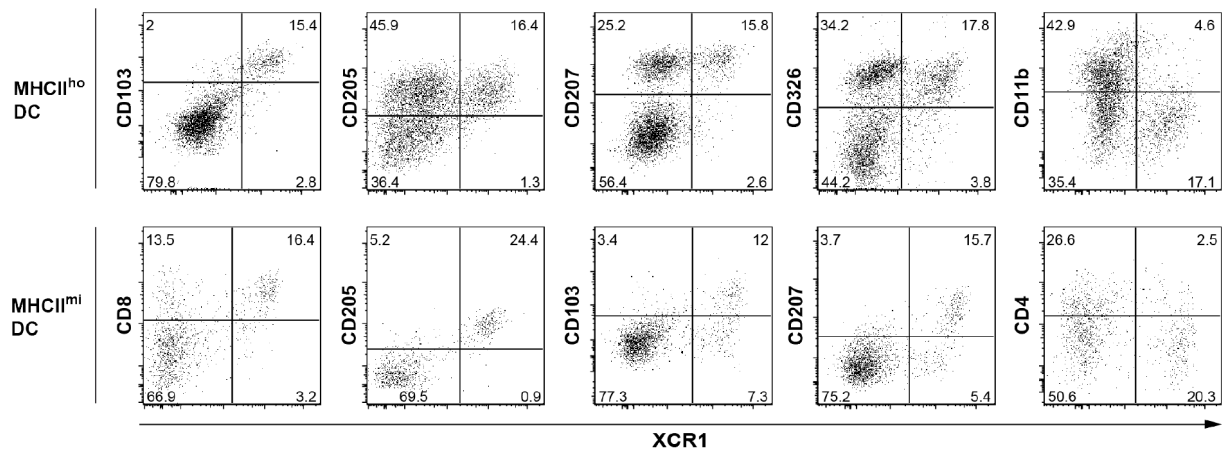


Abb. 18 XCR1 korreliert mit CD103 auf migratorischen DC und CD8 sowie CD205 auf residenten DC der Haut-dränierenden Lymphknoten

CD11c⁺MHCII⁺Lin⁻ Zellen Haut-dränierender Lymphknoten von C57BL/6, CD207:GFP und B6.XCR1:lacZ Mäusen wurden als konventionelle dendritische Zellen (cDC) definiert und in migratorische (MHCII^{ho}) und residente (MHCII^{mi}) unterteilt. Beide DC-Subtypen wurden mit den angegebenen Rezeptoren und dem Liganden XCL1 gefärbt und in der Durchflusszytometrie analysiert. Die Abtrennung der XCR1-positiven Zellen erfolgte anhand der B6.XCR1:lacZ Kontrollen, deren Zellen kein XCR1 exprimieren.

3.4.3 Bestimmung der XCR1-Expression der Haut

Neben lymphatischen Organen sollte auch die als peripheres Gewebe geltende Haut auf die XCR1-Expression hin untersucht werden. Dazu wurden in Kooperation mit P. Stoitzner (Univ. Klinik für Dermatologie und Venerologie, Innsbruck, Österreich) Einzelzellsuspensionen der Gesamt-Haut (Dermis und Epidermis) hergestellt und die XCR1-Expression durchflusszytometrisch untersucht.

CD11c⁺ Zellen der Haut wurden als konventionelle DC definiert und die XCR1-Expression über die Färbung mit dem an Fluorophore-gekoppelten XCR1-Liganden XCL1 detektiert. Konventionelle DC von C57BL/6 Mäusen zeigten kein spezifisches XCR1-Signal in dieser Analyse (Abb. 19 A). Das unspezifische Hintergrundsignal, das auch auf cDC der B6.XCR1:lacZ Mäuse detektiert wurde, war vergleichsweise hoch. Da zur Aufarbeitung der Zellen der Haut harsche Verdaubedingungen verwendet wurden, könnte diese das XCR1-Molekül verändert haben. Daher wurden zusätzlich Zellen von B6.XCR1:lacZ Mäusen mit dem β -Galaktosidase Substrat FDG gefärbt (siehe Kap. 2.5.1). Auch mithilfe dieser Färbemethode konnte kein XCR1-Signal erhalten werden (Abb. 19 B). Zur detaillierten Analyse der XCR1-Expression einzelner DC-Subtypen der Haut wurden zudem isolierte unreife und reife Langerhans-Zellen der Epidermis sowie reife dermale DC auf ein XCR1-Signal hin untersucht. Es konnte in keinem Fall XCR1 durchflusszytometrisch detektiert werden (nicht gezeigt).

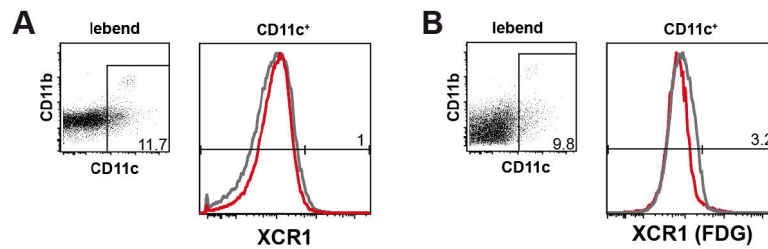


Abb. 19 XCR1 kann auf Zellen der Haut nicht in der Durchflusszytometrie detektiert werden

Dermis und Epidermis von C57BL/6 (schwarz) und B6.XCR1:lacZ (grau) Mäusen wurden zu Einzelsuspensionen verarbeitet. Konventionelle dendritische Zellen der Haut wurden als CD11c⁺ Zellen definiert. Die XCR1-Expression wurde auf Proteinebene mit XCL1-Strep-PE (A) oder auf mRNA-Ebene mit Fluorescein di-β-D-galaktopyranosid (B) detektiert.

Da die Aufarbeitung von Haut zu Einzelsuspensionen zeitaufwendig ist und, wie bereits erwähnt, zudem mehrere starke Verdauungsschritte beinhaltet, besteht die Möglichkeit, dass durch die Präparation der Haut das XCR1-Signal verloren ging. Daher sollte die Haut durch eine qRT-PCR auf das Vorhandensein von XCR1-mRNA untersucht werden. Gesamt-Haut von C57BL/6 Tieren wurde homogenisiert und aus dem entstandenen Lysat die RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels XCR1-spezifischer qRT-PCR analysiert. Als Positivkontrolle wurde eine qRT-PCR, spezifisch für β-2-Mikroglobulin-mRNA, mit denselben Proben durchgeführt. Das β-2-Mikroglobulin wird als Bestandteil des MHC I-Komplexes auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert und diente als interner Standard (Cluzel-Tailhardat *et al.* 2007). Als Negativkontrolle wurde parallel Haut von B6.XCR1:lacZ Tieren aufgearbeitet und analysiert.

Die XCR1-spezifische qRT-PCR zeigte, dass XCR1 in den Haut-Proben, unabhängig vom Mausstamm und der Art der Aufarbeitung, nicht exprimiert wurde (nicht gezeigt). Durch die Verwendung eines XCR1 Plasmidstandards wurde sichergestellt, dass die qRT-PCR zur Detektion von XCR1 funktionierte. Die Expression von β-2-Mikroglobulin in den einzelnen Haut-Proben war im Bereich des eingesetzten Plasmidstandards. Diese Analyse zeigte, dass die RNA der Haut-Proben generell für die qRT-PCR geeignet war.

3.4.4 Die Entwicklung XCR1-positiver dendritischer Zellen lymphatischer Organe ist stark abhängig von den Transkriptionsfaktoren Batf3 und IRF-8

Residente CD8⁺ DC der Milz und migratorische CD103⁺ DC der Peripherie sind in *Batf3*- und *Irf8*-defizienten Mäusen stark reduziert (Edelson *et al.*, 2010; Hashimoto *et al.*, 2011). Innerhalb dieser Arbeit konnte demonstriert werden, dass XCR1⁺ DC der Milz, oder

zumindest das Molekül XCR1, in *Batf3*- und *IRF-8*-defizienten Tieren komplett fehlen (Kap. 3.2.3). Durch die Korrelation der Expression von XCR1 und CD103 im Thymus (nicht gezeigt) sowie den Haut-dränierenden LN, sollten diese Organe der *Batf3*- und *Irif-8*-defizienten Tiere auf ihre XCR1-Expression hin untersucht werden. Als Kontrolle wurden 129/Sv WT Mäuse verwendet, auf deren Hintergrund die TF-defizienten Tiere generiert wurden.

Von den Thymozyten der 129/Sv WT Kontrolltiere waren etwa 45 % der cDC XCR1-positiv (Abb. 20 A, obere Reihe). Es wurde zudem eine distinkte CD172a⁺ DC-Population sichtbar, die kaum XCR1 exprimiert. Die Frequenz und der Phänotyp dieser zwei DC-Populationen der Thymi von 129/Sv WT Tieren war vergleichbar mit denen der C57BL/6 Tiere (vgl. Kapitel 3.4.1). Die CD103-Expression der DC des Thymus überschneidet sich zu großen Teilen, aber nicht komplett, mit der XCR1-Expression. In den *Batf3*-defizienten Tieren war der Anteil der XCR1⁺ DC deutlich verringert, wenn diese auch nicht komplett fehlten (Abb. 22 A, mittlere Reihe). Während sich im Thymus der 129/Sv WT Mäuse 45 % XCR1⁺ DC befanden, waren im Thymus der *Batf3*-defizienten Tiere knapp 15 % XCR1⁺ DC detektierbar. Die Hälfte dieser XCR1⁺ DC exprimiert zusätzlich CD172a und CD103. Im Kontrast zu den geringen Anteilen von XCR1⁺ DC an Gesamt-DC, war ein Großteil der CD103⁺ bzw. CD172a⁺ DC in den Thymi der *Batf3*-defizienten Tiere vorhanden. Die *Irif-8*-defizienten Tiere zeigten keine XCR1-Expression im Thymus (Abb. 20 A, untere Reihe). Es konnten sowohl CD103⁺ als auch CD172a⁺ DC in diesen Tieren detektiert werden.

Die cDC der Haut-dränierenden LN wurden, wie in Abschnitt 3.4.2 erläutert, in residente (MHCII^{mi}) und migratorische (MHCII^{ho}) DC unterteilt. Knapp 15 % der residenten DC der LN von 129/Sv WT Mäusen exprimierten XCR1, welches stark mit CD8 und leicht mit CD103 korrelierte (Abb. 20 B, obere Reihe). Innerhalb der migratorischen DC korrelierte die XCR1-Expression stark mit CD103. In den LN *Batf3*-defizienter Mäuse waren einige wenige XCR1⁺ DC vorhanden (Abb. 20 B, mittlere Reihe). Diese XCR1⁺ Population beschränkte sich ausschließlich auf die residenten DC und umfasste ca. 9 % der Zellen. Diese XCR1⁺ DC exprimierten kein CD8 und CD103. Unter den migratorischen DC waren keine XCR1⁺ Zellen. Die *Irif8*-defizienten Tiere wiesen keine XCR1⁺ DC in den Haut-dränierenden LN auf (Abb. 20 B, untere Reihe).

Geht man davon aus, dass die XCR1⁺ Zellen vom Fehlen der TF Batf3 und IRF-8 betroffen sind und nicht das XCR1-Molekül an sich (siehe Kap. 3.2.3), ist die Entwicklung der XCR1⁺ DC des Thymus und der Haut-dränierenden LN vollständig abhängig von IRF-8 und stark abhängig von Batf3.

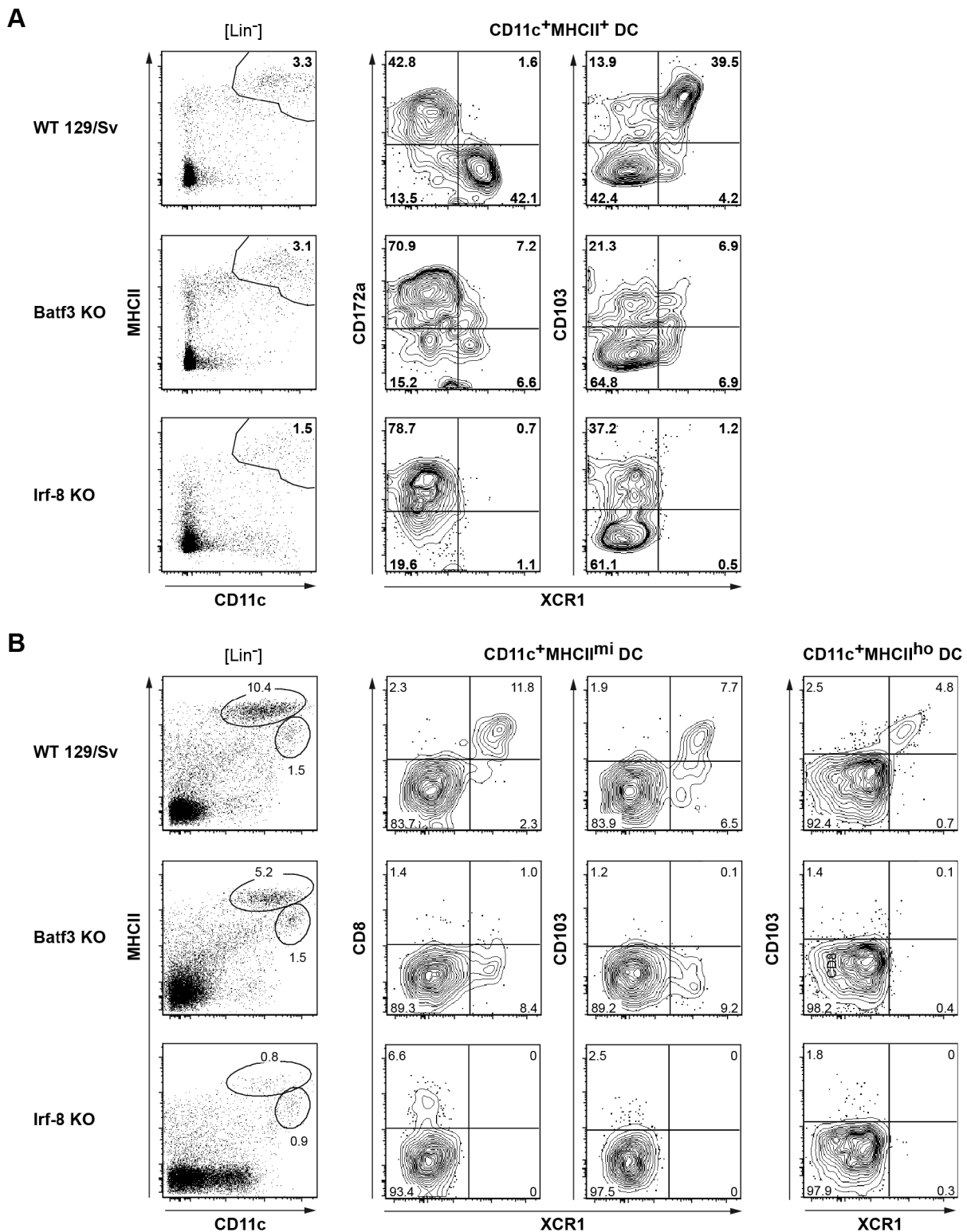


Abb. 20 Die Entwicklung XCR1-positiver dendritischer Zellen lymphatischer Organe ist abhängig von den Transkriptionsfaktoren Batf3 und IRF-8

(A) Thymozyten aus 129/Sv WT, *Batf3*- und *Irf-8*-defizienten Mäusen wurden isoliert und CD11c⁺MHCII⁺Lin⁻ Zellen als konventionelle dendritische Zellen (cDC) definiert (linke Plots). Die XCR1-Expression wurde durchflusszytometrisch mit dem mAk MARX10 bestimmt und den Rezeptoren CD172a sowie CD103 gegenübergestellt (rechte Plots). (B) cDC Haut-dränierender Lymphknoten von 129/Sv WT, *Batf3*- und *Irf-8*-defizienten Mäusen wurden unterteilt in residente (MHCII^{mi}) und migratorische (MHCII^{ho}) DC (linke Plots) und deren XCR1-Expression mit dem mAk MARX10 ermittelt. Residente DC wurden mit CD8 und CD103 gefärbt; migratorische DC ausschließlich mit CD103 (rechte Plots).

3.5 Charakterisierung humaner dendritischer Zellen des peripheren Blutes

Es wurden bisher keine Zellen in humanen Organen beschrieben, die den Chemokinrezeptor XCR1 exprimieren. Daher sollte die XCR1-Expression von DC des Menschen analysiert werden. Weil ein Arbeiten mit lymphoiden Geweben des Menschen ethisch schwer vertretbar ist, wurde humanes peripheres Blut als Quelle für DC herangezogen. Die Experimente mit humanem peripherem Blut wurden zusammen mit E. Hartung und S. Güttler durchgeführt, weil parallel mehrere Blutproben und Experimente bearbeitet wurden.

Humane DC sind im Gegensatz zu murinen DC kaum phänotypisch charakterisiert. Es lagen zu Beginn dieser Arbeit zudem keine vergleichenden funktionellen Studien aller DC-Subtypen vor. Die Identifizierung und Isolation der DC in dieser Arbeit basiert auf den Publikationen von Dzionek *et al.* (2000), MacDonald *et al.* (2002), Lindstedt *et al.* (2005) und Piccioli *et al.* (2007). Durch diese Arbeiten wurde gezeigt, dass humane DC CD11c und HLA-DR auf der Oberfläche exprimieren und für die Populationsmarker CD3, CD14, CD19 und CD56 negativ sind. Eingeteilt werden humane DC in pDC, welche CD304- und CD121-positiv sind und wenig CD11c exprimieren und cDC, welche weiter durch die Expression der Rezeptoren CD1c, CD16 und CD141 in drei Subtypen gegliedert werden können.

3.5.1 Etablierung einer spezifischen Sortierungsstrategie für humane dendritische Zellsubtypen

Um die humanen DC-Subtypen des peripheren Blutes funktionell untersuchen zu können, sollte in einem ersten Schritt eine Identifikations- und Sortierungsstrategie entworfen werden. Diese musste zwei wesentliche Kriterien erfüllen: (i) es sollten alle humanen DC-Subtypen des peripheren Blutes eines Spenders untersucht werden können und (ii) der CD141⁺ DC-Subtyp, welcher lediglich 0,04 % aller PBMC ausmacht, musste in ausreichender Menge sortiert werden. Wegen dieser Ansprüche wurden die DC vor der durchflusszytometrischen Sortierung angereichert. Dazu wurde das periphere humane Blut in einem ersten Schritt mithilfe eines Dichtegradienten von Thrombozyten, Erythrozyten und Granulozyten getrennt. In einem zweiten Schritt wurden aus den erhaltenen PBMC die CD141⁺ DC mittels magnetischer Zellsortierung angereichert und aus den CD141-abgereicherten Zellen pDC, CD1c⁺ und CD16⁺ DC über magnetische Zellsortierung konzentriert. Da die Anreicherung mittels magnetischer Partikel nicht zu ausreichend hoher Reinheit der einzelnen Populationen führte (zum Teil lediglich eine Anreicherung auf 2,8 % bei den CD141⁺ DC) wurden im dritten Schritt die angereicherten Zellen mit spezifischen

Antikörpern markiert und mittels Durchflusszytometrie sortiert (Abb. 21 A). Hierbei wurden die DC anhand der Größe und Granularität ausgewählt, die Dubletten verworfen (nicht gezeigt) und dann anhand des DAPI-Farbstoffs tote Zellen von der Analyse ausgeschlossen. $CD11c^+HLA-DR^+$ Zellen wurden als pDC definiert und nur die $CD304^+$ Zellen, die keine populationsspezifischen mAk (Lin) gebunden hatten, sortiert. $CD11c^+HLA-DR^+$ Zellen wurden als cDC abgegrenzt und dann die Zellen, die populationsspezifische mAk exprimierten, verworfen. Sortiert wurden die cDC dann als $CD141^+$, $CD1c^+$ und $CD16^+$ DC. Die Expression dieser drei cDC-Rezeptoren schloss sich gegenseitig aus. Durch diese Sortierungsstrategie konnten die DC-Subtypen erstmals aus jeweils derselben Blutspende mit einer Reinheit von mindestens 97,5 % sortiert werden (Abb. 21 B).

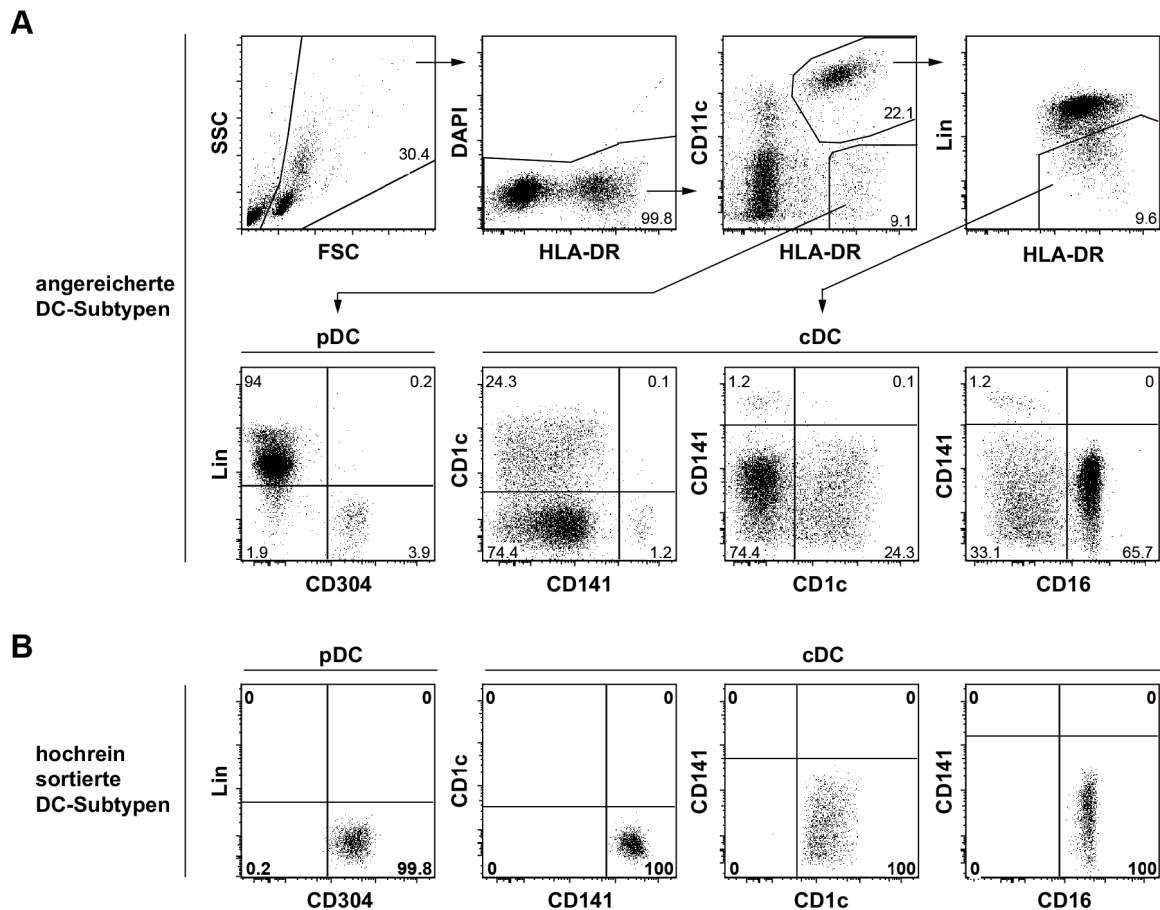


Abb. 21 Sortierungsstrategie humaner dendritischer Zellsubtypen

(A) $CD304^+CD11c^+Lin^-$ Zellen wurden als plasmazytoide DC betrachtet. $CD11c^+HLA-DR^+Lin^-$ Zellen wurden als konventionelle dendritische Zellen (cDC) des peripheren Blutes definiert, wobei der Linien-spezifische Mix (Lin) mAk gegen CD3, CD14, CD19 und CD56 enthielt. Die cDC wurden in die drei Subtypen $CD141^+$, $CD1c^+$ und $CD16^+$ DC unterteilt. Vor der durchflusszytometrischen Sortierung wurden die Zellpopulationen durch Dichtegradientenzentrifugation und magnetisch-aktivierte Zellsortierung angereichert. (B) Reinheit der pDC sowie $CD141^+$, $CD1c^+$ und $CD16^+$ DC-Subtypen nach der durchflusszytometrischen Sortierung.

Der Anteil der DC-Subpopulationen an PBMC sowie deren Anzahl pro 500×10^6 PBMC (die Zellzahl eines durchschnittlichen *buffy coats*) sind in Abb. 22 dargestellt. Abhängig vom Spender lagen die Frequenzen der pDC im Durchschnitt bei 0,3 % ($\pm 0,08$ % StdAbw, $n=6$) die der cDC bei 1,7 % ($\pm 0,94$ % StdAbw, $n=8$) aller lebenden PBMC. Im Durchschnitt enthielten PBMC 0,31 % ($\pm 0,13$ % StdAbw, $n=8$) $CD1c^+$ DC, 0,75 % ($\pm 0,41$ % StdAbw, $n=8$) $CD16^+$ DC und 0,04 % ($\pm 0,03$ % StdAbw, $n=8$) $CD141^+$ DC. Die berechnete Anzahl pro 500×10^6 PBMC entsprach damit durchschnittlich $1,5 \times 10^6$ pDC sowie $8,4 \times 10^6$ cDC. Innerhalb der cDC bestand der Großteil aus $CD16^+$ DC ($4,5 \times 10^6$), gefolgt von den $CD1c^+$ DC ($1,75 \times 10^6$), die kleinste Population bildeten die $CD141^+$ DC mit lediglich $0,34 \times 10^6$ Zellen pro *buffy coat*. Es blieb eine geringe Anzahl an DC, die keinen der drei Rezeptoren exprimierten.

Somit gelang es die genaue Zusammensetzung der DC-Subtypen statistisch zu erfassen und erstmalig ein Eingrenzungsschema zur erfolgreichen Sortierung zu etablieren.

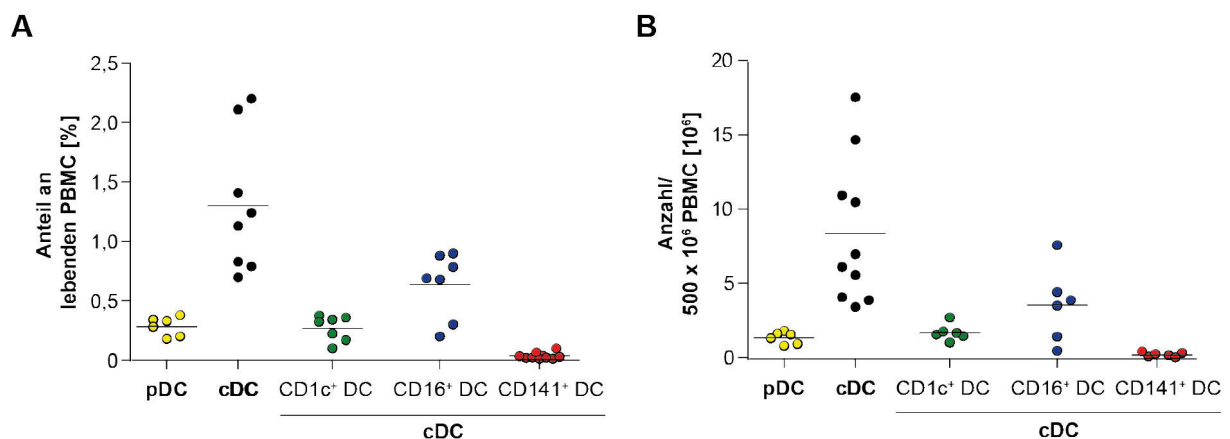


Abb. 22 Der Anteil und die Anzahl dendritischer Zellsubtypen im peripheren Blut des Menschen

Dargestellt sind der Anteil (A) und die Anzahl pro 500×10^6 PBMC (B) dendritischer Zellsubtypen im peripheren Blut ($n \geq 6$).

3.5.2 CD141-positive dendritische Zellen exprimieren spezifisch mRNA des Chemokinrezeptors XCR1

Um Zellen des humanen peripheren Blutes auf die XCR1-Expression hin zu untersuchen, wurde eine sensitive qRT-PCR von S. Güttler und H. W. Mages etabliert. Die Primer wurden so gewählt, dass durch die Exon-überspannende PCR eine Verfälschung der Ergebnisse durch genomische DNA ausgeschlossen wurde (siehe Abb. 23 A). Zur Analyse der XCR1-Expression wurden diverse Zelltypen des humanen peripheren Blutes, unter anderem DC, wie in Abschnitt 3.5.1 beschrieben, sortiert und deren Gesamt-RNA isoliert. Diese wurde in

cDNA umgeschrieben und deren XCR1-mRNA Gehalt durch ein Primer-Sonde-Set quantifiziert.

Die so entwickelte qRT-PCR ergab ein Signal am Detektionslimit, wenn Gesamt-PBMC eingesetzt wurden (300 Kopien bezogen auf 100 ng Gesamt-RNA; Abb. 23 B). Bei sortierten T-, B- und NK-Zellen, Granulozyten, Monozyten, pDC, CD1c⁺ DC und CD16⁺ DC wurde keine XCR1-mRNA detektiert. Im Gegensatz dazu wurde ein starkes XCR1-Signal (700 000 Kopien pro 100 ng Gesamt-RNA) in CD141⁺ DC sichtbar. Zusätzlich wurden MoDC in Kultur generiert (siehe Kap. 2.4.4.8) und ebenfalls getestet, da in bisherigen Arbeiten die Funktion humaner DC hauptsächlich aus Experimenten mit diesen Zellen abgeleitet wurde. MoDC zeigten kein XCR1-Signal in der qRT-PCR.

Bei Verwendung eines zweiten Primer-Sonde-Set konnten identische Ergebnisse erhalten werden (nicht gezeigt). In allen Experimenten wurde als Positivkontrolle die Expression des β -2-Mikroglobulin-Gens verglichen (nicht gezeigt). Dieses Gen ist als Bestandteil des MHC I-Komplexes auf allen analysierten Zellen exprimiert und diente als interner Standard (Cluzel-Tailhardat *et al.* 2007). Alle getesteten Zelltypen wiesen eine vergleichbare Kopienzahl für β -2-Mikroglobulin auf (nicht gezeigt).

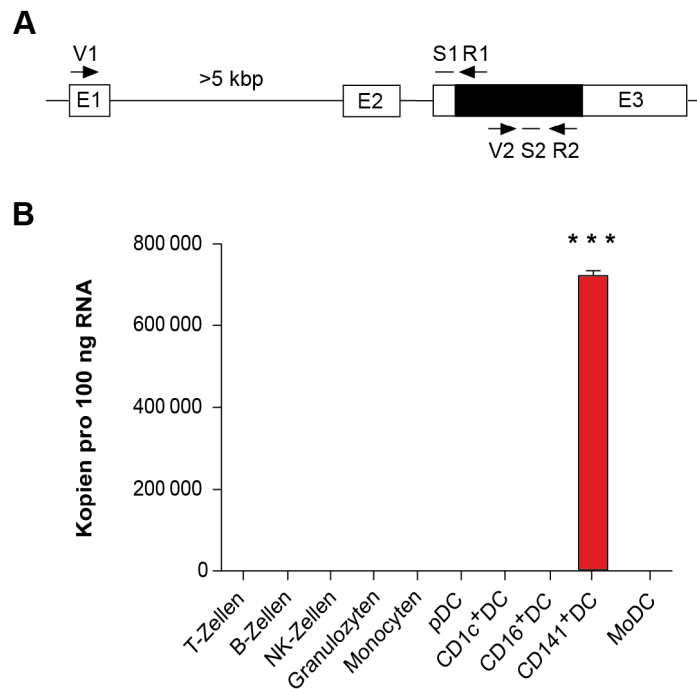


Abb. 23 CD141-positive dendritische Zellen des peripheren Blutes exprimieren XCR1-mRNA

(A) Graphisch dargestellt ist das XCR1-Gen mit seinen drei Exonen (E1-E3) sowie dem kodierenden Bereich (schwarz) im Exon 3 (E3). Es wurden qRT-PCR mit zwei unterschiedlichen Primer-Sonde-Paaren durchgeführt. Das Primer-Sonde-Paar 1 (V1, R1, S1) war Exon-überspannend. Das zweite Primer-Sonde-Paar (V2, R2, S2) umfasst nur einen Teil des kodierenden Bereichs. (B) Die auf der X-Achse angegebenen Zellpopulationen wurden aus dem peripheren Blut durchflusszytometrisch isoliert. Es wurde ihre RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und eine qRT-PCR (V1, R1, S1) zur Detektion des XCR1-Signals durchgeführt. Parallel wurde eine qRP-PCR für β -2-Mikroglobulin durchgeführt und die XCR1-Expression daran normiert (Mittelwert \pm StdAbw aus zwei Experimenten; ***: $p < 0,001$).

3.5.3 CD141-positive dendritische Zellen exprimieren XCR1 auf der Zelloberfläche

Murines XCL1 bindet spezifisch an den murinen und humanen XCR1-Rezeptor. Daher konnte mittels des murinen XCL1-Färbereagens der humane XCR1-Rezeptor auf der Zelloberfläche von PBMC durchflusszytometrisch detektiert werden.

Hierzu wurden cDC unterteilt in CD141⁺ und CD141⁻ DC; die CD141⁻ DC enthielten damit sowohl die CD1c⁺ als auch die CD16⁺ DC (Abb. 26, linker Plot). Zusätzlich zu den mAk, die die einzelnen DC Populationen definierten, wurden die Zellen mit dem XCL1-Färbereagens inkubiert. Als Negativkontrolle wurde lediglich das Sekundärreagens eingesetzt.

Ausschließlich CD141⁺ DC exprimierten den XCR1-Rezeptor auf Proteinebene (Abb. 24, linkes Histogramm). CD1c⁺ und CD16⁺ DC waren negativ für XCR1 (Abb. 24, rechtes Histogramm). Die Spender variierten in dem Anteil der XCR1-exprimierenden Zellen an CD141⁺ DC und zeigten eine Expression von durchschnittlich 60-80 %. In dieser Eigenschaft

gleichen die humanen $CD141^+$ DC den $CD8^+$ DC der Maus, von denen ebenfalls ca. 83 % XCR1 auf der Oberfläche tragen.

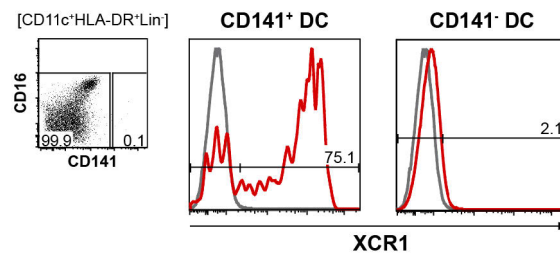


Abb. 24 Der Rezeptor XCR1 ist ausschließlich auf CD141-positiven dendritischen Zellen des peripheren Blutes exprimiert

Lymphozyten des peripheren Blutes wurden durch Dichtegradientenzentrifugation angereichert und durchflusszytometrisch auf ihre XCR1-Expression hin untersucht. $CD11c^+HLA-DR^+Lin^-$ Zellen wurden als konventionelle dendritische Zellen definiert und nach ihrer CD141-Expression in zwei Subtypen unterschieden. Die XCR1-Färbung erfolgte mit dem murinen XCL1-Färbereagenz.

3.5.4 Die Peptidpräsentation an $CD8^+$ T-Zellen ist bei allen humanen dendritischen Zellsubtypen vergleichbar

Um die Fähigkeit der intrinsischen Präsentation verschiedener humaner DC-Subtypen zu vergleichen, wurden DC-Subtypen, wie in Abschnitt 3.5.1 beschrieben, von HLA-A*0201-positiven Spendern sortiert. Es wurde Blut HLA-A*0201-positiver Spender gewählt, weil der verwendete T-Zell-Klon das CMV-Peptid pp65₄₉₅₋₅₀₃ im Kontext dieses HLA-Serotyps erkennt (Fonteneau *et al.*, 2001). Die pDC und cDC-Subtypen $CD1c^+$, $CD16^+$ und $CD141^+$ wurden mit dem $CD8^+$ T-Zell-Klon 10 sowie dem humanem CMV-Peptid pp65₄₉₅₋₅₀₃ koinkubiert. Zur Bestimmung der Peptidpräsentation wurde die IFN- γ Sekretion des T-Zell-Klons 10 im Überstand der Kulturen mittels eines spezifischen ELISA gemessen. Die IFN- γ Produktion des T-Zell-Klons bei Koinkubation mit pDC war schwächer ausgeprägt als bei Inkubation mit den anderen DC-Subtypen (800 pg/ml; Abb. 25). Dieses Phänomen könnte an der geringeren Expression der HLA-Moleküle von pDC liegen (Robinson *et al.*, 1999). Die drei cDC-Subtypen $CD1c^+$, $CD16^+$ und $CD141^+$ DC sowie MoDC regten die Stimulation der IFN- γ Produktion des T-Zell-Klons in gleichem Maße an (1 900-3 600 pg/ml).

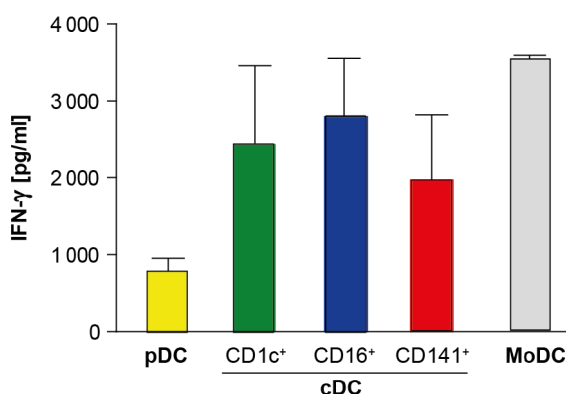


Abb. 25 Die Peptidpräsentation der DC-Subtypen des peripheren Blutes ist vergleichbar

Dendritische Zellsotypen des peripheren Blutes wurden angereichert, isoliert und 1×10^5 Zellen der Subtypen mit dem pp65-Peptid₄₉₅₋₅₀₃ inkubiert ($1 \mu\text{g/ml}$). Die Zellen wurden gewaschen und mit dem humanen CMV-spezifischen CD8⁺ T-Zell Klon 10 kokultiviert. Nach 12 h wurde die IFN- γ -Sekretion der T-Zellen im Überstand mittels ELISA bestimmt. Dargestellt ist die IFN- γ Sekretion der CD8⁺ T-Zellen nach Inkubation mit pDC (gelb), CD1c⁺ (grün), CD16⁺ (blau) und CD141⁺ (rot), cDC oder MoDC (grau).

3.5.5 CD141-positive dendritische Zellen kreuzpräsentieren effektiv lösliches und zelluläres Antigen

Wegen des äußerst geringen Anteils von CD141⁺ DC an PBMC und der daraus resultierenden Schwierigkeit der Aufreinigung, wurde deren Fähigkeit zur Kreuzpräsentation bisher noch nie untersucht. Durch die spezifische XCR1-Expression dieser Zellen und dem Wissen, dass die XCR1-Expression und die Kreuzpräsentation im murinen System assoziiert sind, sollten die humanen CD141⁺ DC ebenfalls auf diese Eigenschaft hin untersucht werden. Da die Frequenz zu gering war um die CD141⁺ DC weiter in XCR1⁺CD141⁺ und XCR1⁻CD141⁺ aufzutrennen, wurde die gesamte Population der CD141⁺ DC mit den CD1c⁺, CD16⁺ cDC und den pDC verglichen.

Die einzelnen DC-Subtypen wurden jeweils aus PBMC HLA-A*0201-positiver Spender sortiert (siehe Abschnitt 3.5.1) und mit dem humanem CMV Protein pp65 sowie einem CD8⁺ T-Zell-Klon kokultiviert. Als Kontrolle wurden DC oder T-Zellen alleine kultiviert oder der Kokultur das Protein OVA zugegeben. Dessen prozessierte Peptide werden nicht vom pp65-spezifischen T-Zell-Klon erkannt. Die IFN- γ Sekretion des CD8⁺ T-Zell-Klons wurde mit Hilfe eines ELISA der Überstände bestimmt.

Die Inkubation mit dem Kontrollprotein OVA führte zu einer schwachen Sekretion von IFN- γ durch den T-Zell-Klon 10, unabhängig vom eingesetzten DC-Subtyp (Abb. 26 A). Sowohl die CD1c⁺ und CD16⁺ cDC als auch die pDC kreuzpräsentierten das lösliche pp65-Protein relativ schwach (≤ 200 pg/ml IFN- γ). Lediglich die CD16⁺ DC präsentierten das Antigen zu späteren Zeitpunkten (24 oder 36 h) etwas stärker als nach 12 h Kokultur. Die CD141⁺ DC regten im

Vergleich zu den anderen DC-Subtypen den T-Zell-Klon stärker zur IFN- γ Produktion an. Nach 24 h und vor allem nach 36 h produzierte der T-Zell-Klon bis zu 1 250 pg/ml IFN- γ .

Zusätzlich wurde die Kreuzpräsentation von zellassoziertem Antigen getestet (siehe Kap. 3.3.2.3). Innerhalb dieser Experimente wurde die Anzahl der DC titriert, während die Anzahl der T-Zellen des Klons 61 konstant gehalten wurde (Abb. 26 B). Bei Verwendung des Peptids MART-1₂₇₋₃₅, welches nicht von dem pp65-spezifischen T-Zell-Klon erkannt wird, wurde eine schwache Sekretion von IFN- γ durch den T-Zell-Klon 61 detektiert. Diese schwache Sekretion war unabhängig vom eingesetzten DC-Subtyp. Der relativ hohe IFN- γ Wert (2 300 pg/ml) bei Verwendung der CD1c⁺ DC konnte in anderen Experimenten nicht bestätigt werden und könnte auf eine unspezifische Aktivierung des T-Zell-Klons zurückzuführen sein. Peptide des pp65-Proteins wurden von den CD1c⁺ und CD16⁺ DC relativ schwach an den T-Zell-Klon präsentiert. Erst bei einem Verhältnis von 1:1 von DC zu T-Zellen wurden 1 400 pg/ml IFN- γ detektiert. Die CD141⁺ DC hingegen stimulierten die T-Zellen schon bei einem Verhältnis von 1:4 zur IFN- γ Produktion. Bei einem Verhältnis von 1:2 und 1:1 war ein wesentlich höheres IFN- γ Signal (\geq 1 800 pg/ml) des T-Zell-Klons detektierbar.

Zusammenfassend waren die CD141⁺ DC, die XCR1-positiven Zellen des humanen peripheren Blutes, sehr effektiv in der Kreuzpräsentation von löslichem und zellulärem Antigen.

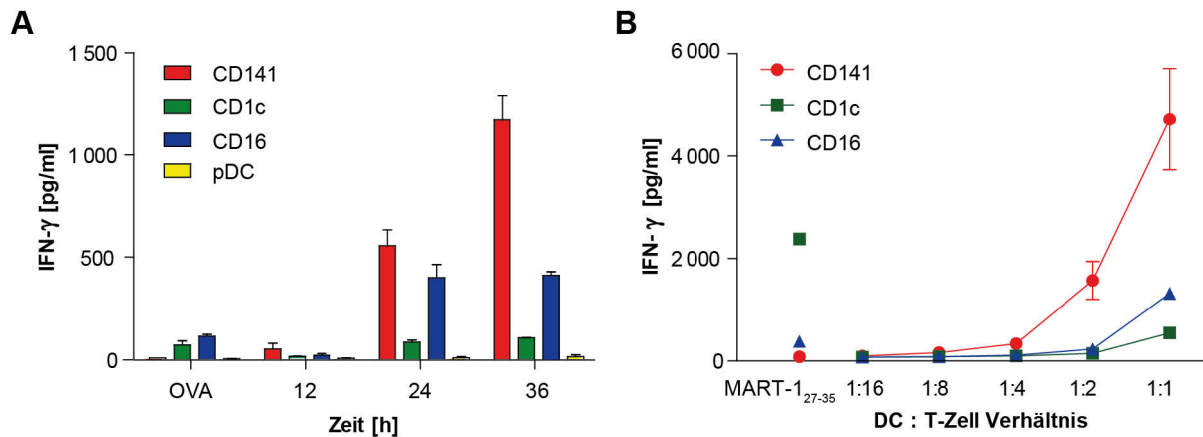


Abb. 26 CD141-positive dendritische Zellen stimulieren CD8⁺ T Zellen effektiv durch Kreuzpräsentation von löslichem und zellassoziertem Antigen

(A) Der CD8⁺ T-Zell-Klon 10, spezifisch für das HLA-A*0201-restringierte Peptid pp65₄₉₅₋₅₀₃ wurde mit CD141⁺, CD1c⁺, CD16⁺ DC oder pDC kokultiviert, die aus einem *buffy coat* eines HLA-A*0201-positiven Spenders isoliert wurden. Den Kulturen wurde rekombinantes lösliches HCMV pp65-Protein zugegeben (3 µg/ml). Nach 12, 24 und 36 h wurde die Aktivierung des T-Zell-Klons durch Messung der IFN-γ Konzentration des Überstandes bestimmt. Als Negativkontrolle wurde für 36 h das irrelevante Protein OVA eingesetzt (3 µg/ml). (B) CD141⁺, CD1c⁺ und CD16⁺ DC wurden aus Leukapherese-Produkten HLA-A*0201-positiver Spendern isoliert und mit dem T-Zell-Klon 61 in verschiedenen Verhältnissen (1:1 bis 1:16) mit zellassoziertem pp65 Antigen kokultiviert. Die IFN-γ Konzentration der Überstände wurde nach 24 h gemessen. Als Negativkontrolle wurde das irrelevante Peptid MART-1₂₇₋₃₅ eingesetzt (1 µg/ml).

4 Diskussion

Die Kreuzpräsentation von Antigenen durch DC spielt eine zentrale Rolle in der Aktivierung zytotoxischer CD8⁺ T-Zellen zur Abwehr infizierter oder entarteter Zellen. Zudem ist diese Art der Antigenpräsentation wesentlich an der Aufrechterhaltung der Toleranz gegenüber Selbst-Antigenen beteiligt. Im Mausmodell sind kreuzpräsentierende DC gut charakterisiert, wobei bisher kein spezifischer Rezeptor dieser Zellen charakterisiert wurde. Hauptsächlich wurde das Oberflächenmolekül CD8 verwendet, um murine kreuzpräsentierende DC der Milz zu definieren (den Haan *et al.*, 2000; Pooley *et al.*, 2001). Zur Abgrenzung kreuzpräsentierender DC der Peripherie wurde das Integrin CD103 eingeführt (del Rio *et al.*, 2007; Henri *et al.*, 2007; Bedoui *et al.*, 2009b; Henri *et al.*, 2010). Beide Moleküle sind jedoch nicht selektiv auf kreuzpräsentierenden Zellen exprimiert (Lin *et al.*, 2008; Farrand *et al.*, 2009; Qui *et al.*, 2009; Bar-On *et al.*, 2010). Der Chemokinrezeptor XCR1 und sein Ligand XCL1 sind an der Interaktion von DC und CD8⁺ T-Zellen nach Antigenkontakt beteiligt und ohne XCL1 kommt es zu einer verminderten Anzahl und Zytotoxizität spezifischer CD8⁺ T-Zellen (Dorner *et al.*, 2009). Die Expression von XCR1 in CD8⁺ und DN DC konnte nur indirekt durch eine spezifische qPCR oder durch die Verwendung von B6.XCR1:lacZ Reportermäusen nachgewiesen werden.

In dieser Arbeit wurde erstmals die Expression des Chemokinrezeptors XCR1 auf der Oberfläche von murinen DC analysiert und die Kreuzpräsentation dieser Zellen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass 83 % der CD8⁺ und 4 % der DN DC XCR1 auf ihrer Oberfläche exprimieren. Alle DC, die XCR1 exprimierten, waren äußerst effektiv in der Kreuzpräsentation von löslichem sowie zellassoziertem Antigen. DC, die kein XCR1 auf der Zelloberfläche trugen, konnten vor allem zellassozierte Antigene nicht effektiv kreuzpräsentieren. Dadurch wurde ersichtlich, dass die XCR1-Expression von DC mit der effektiven Kreuzpräsentation dieser Zellen korreliert. Bislang war der Korezeptor CD8 namensgebend für kreuzpräsentierende DC der Milz, weil u.a. die ersten Studien zur Kreuzpräsentation mit CD8 als Abgrenzungskriterium durchgeführt wurden (den Haan *et al.*, 2000; Pooley *et al.*, 2001). Zur besseren Vergleichbarkeit von CD8 und XCR1 als Marker kreuzpräsentierender DC, wurden die XCR1⁺ DC in den betreffenden Experimenten in XCR1⁺CD8⁺ und XCR1⁺CD8⁻ DC, die XCR1⁻ DC entsprechend in XCR1⁻CD8⁺ und XCR1⁻CD8⁻ DC unterteilt. Dabei zeigten die XCR1⁺ DC, die kein CD8 auf der Oberfläche

trugen ($\text{XCR1}^+\text{CD8}^-$ DC), eine vergleichbar starke Kreuzpräsentation wie die $\text{XCR1}^+\text{CD8}^+$ DC. Dies demonstriert, dass es auch außerhalb der CD8^+ Population kreuzpräsentierende DC gibt. Zusätzlich waren CD8^+ DC, die kein XCR1 trugen ($\text{XCR1}^-\text{CD8}^+$ DC) nicht bzw. nur sehr schwach zur Kreuzpräsentation von Antigenen befähigt. Damit gibt es innerhalb der CD8^+ Population Zellen, die nicht kreuzpräsentieren können. Erste Hinweise darauf, dass die Assoziation der Expression von CD8 mit den kreuzpräsentierenden DC nicht zu 100 % übereinstimmt, wurden vor kurzem publiziert: Vremec *et al.* (2007) und Bedoui *et al.* (2009a) beschrieben DC, die trotz fehlender CD8-Expression, Antigene kreuzpräsentieren können. Der Phänotyp dieser Zellen wurde als $\text{CD8}^-\text{CD24}^+\text{CD11b}^-\text{CD172a}^-$ charakterisiert und ist damit vergleichbar mit dem der kreuzpräsentierenden $\text{XCR1}^+\text{CD8}^-$ DC dieser Arbeit (siehe Abb. 8). DC, die trotz CD8-Expression nicht zur Kreuzpräsentation befähigt sind, wurden von Bar-On *et al.* (2010) beschrieben. Sie exprimieren CX3CR1 (*fractalkine receptor*) und sind wahrscheinlich mit pDC verwandt. Weiterhin wurde publiziert, dass ein Teil der CD8^+ DC nicht von der Depletion von Cytochrom C betroffen ist (Lin *et al.*, 2008). Durch die Applikation von Cytochrom C werden ausschließlich kreuzpräsentierende DC depletiert, weil diese Zellen extrazelluläres Cytochrom C in das Zytosol einschleusen können, was daraufhin zum Zelltod führt. Und auch Farrand *et al.* (2009) und Qiu *et al.* (2009) konnten CD8^+ DC detektieren, die nicht zur Kreuzpräsentation fähig waren.

Bis heute konnte der Expression von CD8 auf DC keine Funktion zugeordnet werden. Zudem ist die Expression nicht exklusiv auf DC beschränkt (Shortman und Heath, 2010). Weiterhin kann CD8 nicht zur Abgrenzung von kreuzpräsentierenden DC in peripheren Organen der Maus verwendet werden, da es zu ungleichmäßig und schwach auf migratorischen DC exprimiert wird (Shortman und Heath, 2010). Der Chemokinrezeptor XCR1 stellt somit den ersten Rezeptor dar, der spezifisch auf kreuzpräsentierenden DC der Milz exprimiert wird.

Weitere Moleküle zur Charakterisierung kreuzpräsentierender DC der Milz sind CD103, CD205, CD207 und Clec9A (Shortman und Heath, 2010). Durch die Etablierung der Oberflächenfärbung des murinen Chemokinrezeptors XCR1 mit dem mAk MARX10 wurde eine Korrelation der Expression von XCR1 mit diesen Molekülen auf der Zelloberfläche möglich. Stark ausgeprägt war die Korrelation von XCR1 mit den Rezeptoren CD205 und Clec9A. Der Endozytoserezeptor CD205 wird zusätzlich zu DC auf B-Zellen, Epithelzellen und Stromazellen exprimiert (Jiang *et al.*, 1995). Der C-Typ-Lektin-ähnliche Rezeptor Clec9A kommt neben DC auch auf pDC und einem Teil der B-Zellen vor (Caminschi *et al.*, 2008; Sancho *et al.*, 2008).

Die Expression der Moleküle CD103 und CD207 korrelierte mäßig mit der von XCR1 auf DC der Milz. Durch die Abhängigkeit von GM-CSF und anderen Zytokinen variiert die Expression von CD103 stark (Shortman und Heath, 2010; Sathe *et al.*, 2011). Zudem wird dieses Integrin auf einem Teil der T-Zellen exprimiert (Kilshaw *et al.*, 1990). CD207 wird auf einem Subtyp kreuzpräsentierender DC der Milz exprimiert (Farrand *et al.*, 2009). Splenozyten aus C57BL/6 Mäusen exprimieren CD207 jedoch nur intrazellulär, wodurch CD207 nicht für eine Sortierung dieser Zellen verwendet werden kann.

Nur der Chemokinrezeptor XCR1 ist selektiv auf kreuzpräsentierenden DC der Milz exprimiert, wodurch er zur Abgrenzung dieses Zelltyps verwendet werden kann.

Zellen des Thymus und der Haut-dränierenden LN wurden auch auf ihre XCR1-Expression untersucht. Von E. Hartung und S. Güttler wurden weiterhin die Lunge, die Lamina Propria des intestinalen Traktes sowie deren dränierende LN analysiert. In allen untersuchten Organen konnten XCR1⁺ DC detektiert werden. Es konnte eine hohe Korrelation zwischen der Expression von XCR1 und CD103 festgestellt werden. CD103 ist zur Detektion kreuzpräsentierender DC diverser Organe etabliert (Sung *et al.*, 2006; del Rio *et al.*, 2007; Bedoui *et al.*, 2009b; Shortman und Heath, 2010). Erste Untersuchungen der Kreuzpräsentation von DC der Haut-dränierenden LN nach i.v. Antigengabe zeigten keine verstärkte Fähigkeit der XCR1⁺ DC in der Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen (nicht gezeigt). Die Applikation des Antigens kann die Ergebnisse des Assays jedoch stark beeinflusst haben. So wurde z.B. gezeigt, dass alle DC-Subpopulationen des intestinalen Traktes systemisch appliziertes Antigen kreuzpräsentieren können. Wird das Antigen hingegen oral verabreicht, sind ausschließlich CD103⁺ DC effektiv (Jaenssen *et al.*, 2008). Daher sollte die Applikation des Antigens bei der Untersuchung der Kreuzpräsentation durch DC der Haut-dränierenden LN variiert werden, bevor eine endgültige Aussage zur Kreuzpräsentation durch XCR1⁺ DC der Peripherie gemacht werden kann.

Das einzige untersuchte Organ, in dem keine XCR1-Expression festgestellt werden konnte, war die Haut. Weder in der Durchflusszytometrie, noch bei der Analyse der mRNA durch qRT-PCR konnte ein XCR1-Signal detektiert werden, obwohl alle Kontrollen verlässliche Ergebnisse lieferten. Trotzdem sprechen einige Argumente dafür, dass XCR1⁺ DC in der Haut vorkommen. Zum einen wurden $\gamma\delta$ T-Zellen in der Haut entdeckt, die den Liganden XCL1 sekretieren (Boismenu *et al.*, 1996). Es müsste also XCR1⁺ Zellen in der Haut geben, die durch XCL1 angelockt werden können. Zum anderen konnten in den Haut-dränierenden LN migratorische (MHC II^{ho}) XCR1⁺ DC detektiert werden. Da migratorische DC aus der Haut in

die LN einwandern, sollte es theoretisch auch XCR1⁺ DC in der Haut geben (Ohl *et al.*, 2003). Vor allem zeigten Crozat *et al.* (2011) ein XCR1-Signal durch eine Färbung mit dem β -Galaktosidase Substrat FDG in dermalen CD103⁺ DC von B6.XCR1:LacZ Mäusen. Entweder ist also die Anzahl der XCR1⁺ DC so gering, dass sie bei der hier gezeigten Untersuchung unter dem Detektionslimit lagen oder sie wandern nur unter bestimmten Umständen (z.B. während einer Infektion) in die Haut ein.

Für die Entwicklung der CD8⁺ DC der Milz sind der Wachstumsfaktor Flt3 Ligand und die TF IRF-8, Id2, NFIL3 und Batf3 unerlässlich (Maraskovsky *et al.*, 1996; McKenna *et al.*, 2000; Schiavoni *et al.*, 2002; Aliberti *et al.*, 2003; Hacker *et al.*, 2003; Hildner *et al.*, 2008; Edelson *et al.*, 2010; Kashiwada *et al.*, 2011). Der Einfluss dieser Faktoren auf die Entwicklung der XCR1⁺ DC wurde vor Beginn dieser Arbeit nicht untersucht. In den *Irf-8*-defizienten Mäusen sind neben den CD8⁺ DC große Teile des Immunsystems verändert, wie z.B. die Frequenz und Anzahl der Granulozyten und Makrophagen (Holtschke *et al.*, 1996). Des Weiteren haben diese Mäuse stark vergrößerte lymphatische Organe (Holtschke *et al.*, 1996). Die *Batf3*-defizienten Tiere zeigen eine weitgehend unveränderte Zusammensetzung des Immunsystems und dieser TF ist dadurch wesentlich spezifischer für die Entwicklung von DC (Hildner *et al.*, 2008). Auf die Analyse der Abhängigkeit von den TF Id2 und NFIL3, die auch für die Entwicklung der CD8⁺ DC unerlässlich sind, wurde verzichtet. Die *Id2*-defizienten Tiere haben, ähnlich der *Irf-8* KO Tiere, ein stark verändertes Immunsystem. Dazu gehört z.B. das Fehlen von LN und Peyerschen Plaques, sowie eine eingeschränkte Entwicklung der NK-Zellen (Hacker *et al.*, 2003). Der TF NFIL3 liegt in der Signalkaskade des TF Batf3 hinter Batf3 selber, wodurch ähnliche Ergebnisse erwartet werden können wie bei der Analyse der *Batf3* KO Tiere (Kashiwada *et al.*, 2011).

Wurde Tieren Flt3 Ligand appliziert, stieg die Frequenz der XCR1⁺ DC der Milz signifikant. Dabei erhöhte sich sowohl der Anteil der XCR1⁺CD8⁺ als auch der der XCR1⁺CD8⁻ DC um mindestens das 20-fache. Die Frequenz der CD8⁺ DC, die kein XCR1 exprimierten, stieg hingegen kaum an. Damit wirkt sich Flt3 Ligand deutlich auf die Entwicklung der XCR1-exprimierenden DC der Milz aus.

XCR1 konnte in der Analyse von Milzen der *Batf3*- und *Irf-8*-defizienten Mäuse nicht nachgewiesen werden. Dadurch, dass auch die Expression weiterer Moleküle, wie CD8 und CD103 betroffen war, wird angenommen, dass die Population der XCR1⁺ DC fehlt und nicht nur die Expression des Moleküls XCR1 betroffen ist. Vor allem ist die Fähigkeit zur Kreuzpräsentation durch DC dieser Mäuse stark eingeschränkt (Hildner *et al.*, 2008). Daher

kann spekuliert werden, dass die kreuzpräsentierenden XCR1⁺ DC der Milz in diesen Mäusen fehlen. Dies deutet auf eine vollkommene Abhängigkeit der Entwicklung der XCR1⁺ DC der Milz von den TF Batf3 und IRF-8 hin.

In *Batf3*-defizienten Tieren fehlen weiterhin die migratorischen CD103⁺ DC in peripheren Organen (Edelson *et al.*, 2010). Daher wurden die DC des Thymus und der Haut-dränierenden LN *Batf3*- und *Irf-8*-defizienter Tieren analysiert. In beiden untersuchten Organen der *Batf3* KO Tiere waren wenige XCR1⁺ DC detektierbar. In der Lunge, im Darm und deren dränierenden LN konnte XCR1 nicht in den *Batf3*-defizienten Tieren detektiert werden (nicht gezeigt). Alle untersuchten peripheren Organe der *Irf-8* KO Tiere wiesen keine XCR1⁺ DC auf. Die Entwicklung der XCR1⁺ DC der Peripherie ist somit stark abhängig von Batf3 und vollkommen abhängig von IRF-8.

Der Großteil der Studien zur Kreuzpräsentation humaner DC wurde mit Zellen durchgeführt, die entweder aus MoDC oder CD34⁺ hämatopoetischen Vorläuferzellen generiert wurden (Caux *et al.*, 1992; Reid *et al.*, 1992; Romani *et al.*, 1994; Sallusto und Lanzavecchia, 1994). Auch wenn diese Methoden große Mengen an Zellen hervorbringen, ist die Plastizität der Vorläuferzellen ein Problem. Der Phänotyp ist stark abhängig von den Kulturbedingungen, insbesondere von Zytokinen und dem für die Kultur verwendeten Serum. Dadurch kam es in der Vergangenheit immer wieder zur Publikation widersprüchlicher Daten (Schuler-Thurner *et al.*, 2002; Banerjee *et al.*, 2006). Vergleichende Studien zur Kreuzpräsentation von Antigenen durch primäre humane DC-Subtypen fehlten vor Beginn dieser Arbeit. Dies lag vor allem daran, dass der Anteil der CD141⁺ DC an PBMC mit 0,04 % äußerst gering ist. Bei Untersuchungen der Kreuzpräsentation von primären DC lagen daher meist CD141⁺ DC in den Präparationen der anderen DC vor, wodurch die Ergebnisse schwer zu beurteilen sind (Schnurr *et al.*, 2005; Hoeffel *et al.*, 2007; Di Pucchio *et al.*, 2008). Welche Zellen im humanen System XCR1 exprimieren war vor Beginn dieser Arbeit nicht bekannt.

Eine effektive Anreicherung und Isolierung der Zellen des peripheren Blutes war eine zentrale Voraussetzung, um die primären DC zu untersuchen. Wegen der Schwankungen der Frequenz und Aktivierung einzelner Zellpopulationen von individuellen Spendern, sollten die DC-Populationen aus der jeweils gleichen Blutprobe aufgereinigt werden. Durch die innerhalb dieser Arbeit etablierte Anreicherung und Sortierung konnten erstmals die pDC und die drei cDC-Subtypen CD1c⁺, CD16⁺ und CD141⁺ zu hoher Reinheit (≥ 97,5 %) isoliert

werden. In anderen Arbeiten wurden jeweils nur einzelne cDC-Subtypen sortiert (MacDonald *et al.*, 2002; Lindstedt *et al.*, 2005; Piccioli *et al.*, 2007)

Anhand der Sortierungsstrategie wurden neben DC-Subtypen des peripheren Blutes auch DC-Subpopulationen aus dem Thymus und den Tonsillen sortiert (nicht gezeigt). Dadurch konnte demonstriert werden, dass die Strategie zur Sortierung von DC-Subtypen auch auf andere Organe übertragen werden kann. Wegen dem zum Teil abweichenden Phänotyp der DC unterschiedlicher Organe (z.B. eine breite Expression von CD141 auf DC der Tonsille), sollte die Strategie jedoch für jedes zu untersuchende Organ weiter verfeinert werden. Hierzu sollte eine genaue Charakterisierung der DC-Subtypen in den einzelnen Organen vorgeschaltet werden.

Durch die Möglichkeit, die humanen DC-Subtypen in ausreichender Menge zu sortieren, konnte mittels qRT-PCR erstmals die XCR1-Expression der Zellen untersucht werden. Dadurch wurde deutlich, dass ausschließlich CD141⁺ DC mRNA des Chemokinrezeptors XCR1 exprimieren. Bestätigt wurde dieser Befund durch die Arbeit von Crozat *et al.* (2010), die ebenfalls die Expression von XCR1-mRNA in CD141⁺ DC des humanen peripheren Blutes zeigten. Zusätzlich konnte innerhalb der vorliegenden Arbeit demonstriert werden, dass ca. 60 - 80 % der CD141⁺ DC XCR1 auf der Zelloberfläche tragen. Alle anderen untersuchten Zellpopulationen zeigten sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene kein Signal für XCR1. In ersten Experimenten wurden im Thymus CD141⁺ DC gefunden, die ebenfalls XCR1-mRNA exprimieren (nicht gezeigt). CD141⁺ Zellen, die aus Tonsillen isoliert wurden, gaben ebenfalls ein starkes PCR-Signal für XCR1 (nicht gezeigt).

Neben der reinen Expressionsanalyse des Chemokinrezeptors XCR1 wurde auch dessen Funktionalität untersucht (nicht gezeigt). Nach Kontakt mit dem humanen Liganden XCL1 zeigten XCR1⁺ DC einen Kalziuminflux. In einem *ex vivo* Chemotaxis-Assay wurde demonstriert, dass ausschließlich XCR1⁺ DC gerichtet zu XCL1 migrieren.

Damit stellt XCR1 einen Rezeptor dar, der spezifisch auf CD141⁺ DC des humanen peripheren Blutes und einiger Organe exprimiert wird. Er ist für die gerichtete Migration der XCR1⁺ Zellen zu dem Chemokin XCL1 hin verantwortlich.

Durch die effektive Sortierung der einzelnen DC-Subtypen konnte die Kreuzpräsentation gegenüberstellend untersucht werden. Dadurch wurde demonstriert, dass die CD141⁺ DC in direktem Vergleich mit den anderen humanen DC-Subtypen überragend in der Kreuzpräsentation von löslichem sowie zellassoziertem Antigen sind. Unabhängig von dieser Arbeit wurden zwei weitere Studien zur Kreuzpräsentation primärer humaner DC-Subtypen

des Blutes veröffentlicht (Crozat *et al.*, 2010; Jongbloed *et al.*, 2010). Auch diese Gruppen demonstrierten, dass CD141⁺ DC sowohl lösliches als auch zellassoziertes Antigen effektiv kreuzpräsentieren können (Jongbloed *et al.*, 2010). Im Unterschied zu den hier gezeigten Daten war eine Stimulation der CD141⁺ DC mit Adjuvant notwendig, um eine effektive Präsentation zu erreichen (Crozat *et al.*, 2010; Jongbloed *et al.*, 2010). Eine weitere vergleichende Studie von DC-Subtypen des peripheren Blutes demonstrierte kürzlich, dass alle DC-Subtypen des Blutes Antigen kreuzpräsentieren können (Mittag *et al.*, 2011). Den widersprüchlichen Ergebnissen könnten folgende Unterschiede der Assays zu Grunde liegen: (i) Die Sortierung der DC-Subtypen wurde in allen Fällen unterschiedlich durchgeführt. So wurde zur Voranreicherung der CD141⁺ DC von Crozat *et al.* (2010) und Jongbloed *et al.* (2010) eine Abreicherung von Zellen, die Populationsmarker exprimieren, vorgeschaltet. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit vermieden, um die Zellen möglichst schnell zu isolieren. Ein dadurch unterschiedlicher Aktivierungsstatus der DC könnte zu Differenzen in der Antigenaufnahme und -präsentation geführt haben. (ii) Dem Kulturmedium wurde innerhalb dieser Arbeit FCS zugegeben, bei den anderen Gruppen wurde humanes Serum verwendet. Weiterhin wurde dem Medium von Crozat *et al.* ein Aktivierungsstimulus zugefügt. Auch diese unterschiedlichen Kulturbedingungen können zu einer unterschiedlich starken Aktivierung der DC geführt haben. (iii) Jongbloed *et al.* verwendeten, wie in der vorliegenden Arbeit, einen pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen T-Zell-Klon. Crozat *et al.* verwendeten hingegen einen HIV-Pol₄₇₆₋₄₈₄-spezifischen T-Zell-Klon. Die T-Zellen, die innerhalb dieser Arbeit verwendet wurden, wurden vor Präsentationsassays zehn Tage in Kultur belassen, damit sie einen Ruhezustand erreichen konnten. Also könnten auch die T-Zellen unterschiedlich stark aktiviert worden sein. (iv) Das zellassozierte Antigen wurde in allen drei Fällen anders hergestellt. Jongbloed *et al.* nutzte HCMV-infizierte nekrotische Zellen, Crozat *et al.* setzten als Antigen chronisch mit HIV infizierte H9 Zellen ein und in dieser Arbeit wurden transfizierte, mehrmals eingefrorene und aufgetaute, HeLa-Zellen verwendet. Auch durch unterschiedliche Antigene kann es zu einer mehr oder weniger starken Aktivierung der T-Zellen gekommen sein.

Ein Großteil der kreuzpräsentierenden CD141⁺ DC exprimiert den Chemokinrezeptor XCR1. Welche Rolle die Expression von XCR1 bei der Kreuzpräsentation im humanen System spielt, bleibt aber ungeklärt. Um dies zu untersuchen, könnte man z.B. eine Sortierung der XCR1⁺CD141⁺ und XCR1⁻CD141⁺ Zellen etablieren.

Die Expression der Moleküle Necl2 und Clec9A auf den CD8⁺ DC der Maus und den CD141⁺ DC des Menschen führte zu der Annahme, dass diese Zellen Homologe darstellen könnten (Galibert *et al.*, 2005; Caminschi *et al.*, 2008; Sancho *et al.*, 2008). Durch vergleichende Genexpressionsstudien aller bekannten humanen und murinen DC-Subtypen wurde diese Hypothese weiter unterstützt (Robbins *et al.*, 2008).

Weiterhin exprimieren sowohl die CD8⁺ DC der Maus als auch die CD141⁺ DC des Menschen TLR3, aber nicht TLR7 (Jongbloed *et al.*, 2010; Mittag *et al.*, 2011). Beide Populationen sekretieren IL-12p70 nach spezifischer Aktivierung (Jongbloed *et al.*, 2010). Die Menge der IRF-8/TYROBP-mRNA der CD141⁺ DC ist höher als bei CD1c⁺ DC (Jongbloed *et al.*, 2010) und murine CD8⁺ DC exprimieren präferenziell den TF IRF-8 (Aliberti *et al.*, 2003).

Die selektive und spezifische Expression des Chemokinrezeptors XCR1 auf den CD8⁺ DC der Maus und den CD141⁺ DC des Menschen sowie die effektive Kreuzpräsentation beider Populationen bestätigt, dass sie funktionelle Homologe darstellen.

Referenzen

- Aliberti, J., O. Schulz, D.J. Pennington, H. Tsujimura, C. Reis e Sousa, K. Ozato, und A. Sher. 2003. Essential role for ICSBP in the in vivo development of murine CD8 α^+ dendritic cells. *Blood* 101:305-310.
- Alt, F., N. Rosenberg, S. Lewis, E. Thomas, und D. Baltimore. 1981. Organization and reorganization of immunoglobulin genes in A-MULV-transformed cells: rearrangement of heavy but not light chain genes. *Cell* 27:381-390.
- Andrews, D.M., E. Maraskovsky, und M.J. Smyth. 2008. Cancer vaccines for established cancer: how to make them better? *Immunological reviews* 222:242-255.
- Bachem, A., E. Hartung, S. Güttler, A. Mora, X. Zhou, A. Hegemann, M. Plantinga, E. Mazzini, P. Stoitzner, S. Gurka, V. Henn, H.W. Mages, und R.A. Kroczeck. 2012. Expression of XCR1 Characterizes the Batf3-Dependent Lineage of Dendritic Cells Capable of Antigen Cross-Presentation. *Frontiers in immunology* 3:214.
- Bacon, K., M. Baggiolini, H. Broxmeyer, R. Horuk, I. Lindley, A. Mantovani, K. Maysushima, P. Murphy, H. Nomiyama, J. Oppenheim, A. Rot, T. Schall, M. Tsang, R. Thorpe, J. Van Damme, M. Wadhwa, O. Yoshie, A. Zlotnik, K. Zoon, und I.W.S.o.C. Nomenclature. 2002. Chemokine/chemokine receptor nomenclature. *Journal of interferon & cytokine research: the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 22:1067-1068.
- Banchereau, J., E. Klechevsky, N. Schmitt, R. Morita, K. Palucka, und H. Ueno. 2009. Harnessing human dendritic cell subsets to design novel vaccines. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1174:24-32.
- Banerjee, D.K., M.V. Dhodapkar, E. Matayeva, R.M. Steinman, und K.M. Dhodapkar. 2006. Expansion of FOXP3^{high} regulatory T cells by human dendritic cells (DCs) in vitro and after injection of cytokine-matured DCs in myeloma patients. *Blood* 108:2655-2661.
- Barnden, M.J., J. Allison, W.R. Heath, und F.R. Carbone. 1998. Defective TCR expression in transgenic mice constructed using cDNA-based α - and β -chain genes under the control of heterologous regulatory elements. *Immunology and cell biology* 76:34-40.
- Bar-On, L., T. Birnberg, K.L. Lewis, B.T. Edelson, D. Bruder, K. Hildner, J. Buer, K.M. Murphy, B. Reizis, und S. Jung. 2010. CX₃CR1⁺ CD8 α^+ dendritic cells are a steady-state population related to plasmacytoid dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107:14745-14750.
- Bar-On, L., und S. Jung. 2010. Defining dendritic cells by conditional and constitutive cell ablation. *Immunological reviews* 234:76-89.
- Bedoui, S., S. Prato, J. Mintern, T. Gebhardt, Y. Zhan, A.M. Lew, W.R. Heath, J.A. Villadangos, und E. Segura. 2009a. Characterization of an immediate splenic precursor of CD8⁺ dendritic cells capable of inducing antiviral T cell responses. *J. Immunol.* 182:4200-4207.
- Bedoui, S., P.G. Whitney, J. Waithman, L. Eidsmo, L. Wakim, I. Caminschi, R.S. Allan, M. Wojtasiak, K. Shortman, F.R. Carbone, A.G. Brooks, und W.R. Heath. 2009b. Cross-presentation of viral and self antigens by skin-derived CD103⁺ dendritic cells. *Nature immunology* 10:488-495.

- Bevan, M.J. 1976a. Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay. *J. Exp. Med.* 143:1283-1288.
- Bevan, M.J. 1976b. Minor H antigens introduced on H-2 different stimulating cells cross-react at the cytotoxic T cell level during in vivo priming. *J. Immunol.* 117:2233-2238.
- Blasius, A.L., E. Giurisato, M. Cella, R.D. Schreiber, A.S. Shaw, and M. Colonna. 2006. Bone marrow stromal cell antigen 2 is a specific marker of type I IFN-producing cells in the naive mouse, but a promiscuous cell surface antigen following IFN stimulation. *J. Immunol.* 177:3260-3265.
- Boismenu, R., L. Feng, Y.Y. Xia, J.C. Chang, and W.L. Havran. 1996. Chemokine expression by intraepithelial $\delta\gamma$ T cells. Implications for the recruitment of inflammatory cells to damaged epithelia. *J. Immunol.* 157:985-992.
- Bozzacco, L., C. Trumpfheller, F.P. Siegal, S. Mehandru, M. Markowitz, M. Carrington, M.C. Nussenzweig, A.G. Piperno, and R.M. Steinman. 2007. DEC-205 receptor on dendritic cells mediates presentation of HIV gag protein to CD8⁺ T cells in a spectrum of human MHC I haplotypes. *Proc. Natl .Acad .Sci. U S A* 104:1289-1294.
- Caminschi, I., A.I. Proietto, F. Ahmet, S. Kitsoulis, J. Shin Teh, J.C. Lo, A. Rizzitelli, L. Wu, D. Vremec, S.L. van Dommelen, I.K. Campbell, E. Maraskovsky, H. Braley, G.M. Davey, P. Mottram, N. van de Velde, K. Jensen, A.M. Lew, M.D. Wright, W.R. Heath, K. Shortman, and M.H. Lahoud. 2008. The dendritic cell subtype-restricted C-type lectin Clec9A is a target for vaccine enhancement. *Blood* 112:3264-3273.
- Caminschi, I., M.H. Lahoud, and K. Shortman. 2009. Enhancing immune responses by targeting antigen to DC. *Eur. J. Immunol.* 39:931-938.
- Caux, C., I. Moreau, S. Saeland, and J. Banchereau. 1992. Interferon-gamma enhances factor-dependent myeloid proliferation of human CD34⁺ hematopoietic progenitor cells. *Blood* 79:2628-2635.
- Cluzel-Tailhardat, M., M. Bonnet-Duquennoy, H. Abaibou, D. Pelle De Qeral, M. Vocanson, K. Lazou, R. Kurfurst, P. Courtellemont, and B. Le Varlet. 2007. Which house-keeping genes for dendritic cell transcriptomic studies? *European journal of dermatology : EJD* 17:457-459.
- Coffman, R.L. 1982. Surface antigen expression and immunoglobulin gene rearrangement during mouse pre-B cell development. *Immunological reviews* 69:5-23.
- Crozat, K., R. Guiton, V. Contreras, V. Feuillet, C.A. Dutertre, E. Ventre, T.P. Vu Manh, T. Baranek, A.K. Storset, J. Marvel, P. Boudinot, A. Hosmalin, I. Schwartz-Cornil, and M. Dalod. 2010. The XC chemokine receptor 1 is a conserved selective marker of mammalian cells homologous to mouse CD8 α ⁺ dendritic cells. *J. Exp. Med.* 207:1283-1292.
- Crozat, K., S. Tamoutounour, T.P. Manh, E. Fossum, H. Luche, L. Ardouin, M. Guilliams, H. Azukizawa, B. Bogen, B. Malissen, S. Henri, and M. Dalod. 2011. Cutting edge: expression of XCR1 defines mouse lymphoid-tissue resident and migratory dendritic cells of the CD8 α ⁺ type. *J. Immunol.* 187:4411-4415.
- Dakic, A., Q.X. Shao, A. D'Amico, M. O'Keeffe, W.F. Chen, K. Shortman, and L. Wu. 2004. Development of the dendritic cell system during mouse ontogeny. *J. Immunol.* 172:1018-1027.

- Davis, I.D., M. Jefford, P. Parente, und J. Cebon. 2003. Rational approaches to human cancer immunotherapy. *Journal of leukocyte biology* 73:3-29.
- del Rio, M.L., J.I. Rodriguez-Barbosa, E. Kremmer, und R. Forster. 2007. CD103⁻ and CD103⁺ bronchial lymph node dendritic cells are specialized in presenting and cross-presenting innocuous antigen to CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *J. Immunol.* 178:6861-6866.
- den Haan, J.M., S.M. Lehar, und M.J. Bevan. 2000. CD8⁺ but not CD8⁻ dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo. *J. Exp. Med.* 192:1685-1696.
- Di Pucchio, T., B. Chatterjee, A. Smed-Sorensen, S. Clayton, A. Palazzo, M. Montes, Y. Xue, I. Mellman, J. Banachereau, und J.E. Connolly. 2008. Direct proteasome-independent cross-presentation of viral antigen by plasmacytoid dendritic cells on major histocompatibility complex class I. *Nature immunology* 9:551-557.
- Dorner, B.G., A. Scheffold, M.S. Rolph, M.B. Huser, S.H. Kaufmann, A. Radbruch, I.E. Flesch, und R.A. Kroczeck. 2002. MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, and ATAC/lymphotactin function together with IFN- γ as type 1 cytokines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 99:6181-6186.
- Dorner, B.G., M.B. Dorner, X. Zhou, C. Opitz, A. Mora, S. Güttler, A. Hutloff, H.W. Mages, K. Ranke, M. Schaefer, R.S. Jack, V. Henn, und R.A. Kroczeck. 2009. Selective expression of the chemokine receptor XCR1 on cross-presenting dendritic cells determines cooperation with CD8⁺ T cells. *Immunity* 31:823-833.
- Dudziak, D., A.O. Kamphorst, G.F. Heidkamp, V.R. Buchholz, C. Trumpfheller, S. Yamazaki, C. Cheong, K. Liu, H.W. Lee, C.G. Park, R.M. Steinman, und M.C. Nussenzweig. 2007. Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. *Science* 315:107-111.
- Dzionek, A., A. Fuchs, P. Schmidt, S. Cremer, M. Zysk, S. Miltenyi, D.W. Buck, und J. Schmitz. 2000. BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J. Immunol.* 165:6037-6046.
- Edelson, B.T., W. Kc, R. Juang, M. Kohyama, L.A. Benoit, P.A. Klekotka, C. Moon, J.C. Albring, W. Ise, D.G. Michael, D. Bhattacharya, T.S. Stappenbeck, M.J. Holtzman, S.S. Sung, T.L. Murphy, K. Hildner, und K.M. Murphy. 2010. Peripheral CD103⁺ dendritic cells form a unified subset developmentally related to CD8 α ⁺ conventional dendritic cells. *J. Exp. Med.* 207:823-836.
- Farrand, K.J., N. Dickgreber, P. Stoitzner, F. Ronchese, T.R. Petersen, und I.F. Hermans. 2009. Langerin⁺ CD8 α ⁺ dendritic cells are critical for cross-priming and IL-12 production in response to systemic antigens. *J. Immunol.* 183:7732-7742.
- Flavell, D.J., S.U. Flavell, D.A. Boehm, L. Emery, A. Noss, N.R. Ling, P.R. Richardson, D. Hardie, und D.H. Wright. 1995. Preclinical studies with the anti-CD19-saporin immunotoxin BU12-SAPORIN for the treatment of human-B-cell tumours. *British journal of cancer* 72:1373-1379.
- Fonteneau, J.F., M. Larsson, S. Somersan, C. Sanders, C. Munz, W.W. Kwok, N. Bhardwaj, und F. Jotereau. 2001. Generation of high quantities of viral and tumor-specific human CD4⁺ and CD8⁺ T-cell clones using peptide pulsed mature dendritic cells. *J. Immunol. Methods* 258:111-126.
- Fonteneau, J.F., D.G. Kavanagh, M. Lirvall, C. Sanders, T.L. Cover, N. Bhardwaj, und M. Larsson. 2003. Characterization of the MHC class I cross-presentation pathway for cell-associated antigens by human dendritic cells. *Blood* 102:4448-4455.

- Galibert, L., G.S. Diemer, Z. Liu, R.S. Johnson, J.L. Smith, T. Walzer, M.R. Comeau, C.T. Rauch, M.F. Wolfson, R.A. Sorensen, A.R. Van der Vuurst de Vries, D.G. Branstetter, R.M. Koelling, J. Scholler, W.C. Fanslow, P.R. Baum, J.M. Derry, and W. Yan. 2005. Nectin-like protein 2 defines a subset of T-cell zone dendritic cells and is a ligand for class-I-restricted T-cell-associated molecule. *J. Biol. Chem.* 280:21955-21964.
- Grouard, G., M.C. Rissoan, L. Filgueira, I. Durand, J. Banchereau, and Y.J. Liu. 1997. The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *J. Exp. Med.* 185:1101-1111.
- Gurer, C., T. Strowig, F. Brilot, M. Pack, C. Trumpfheller, F. Arrey, C.G. Park, R.M. Steinman, and C. Münz. 2008. Targeting the nuclear antigen 1 of Epstein-Barr virus to the human endocytic receptor DEC-205 stimulates protective T-cell responses. *Blood* 112:1231-1239.
- Hacker, C., R.D. Kirsch, X.S. Ju, T. Hieronymus, T.C. Gust, C. Kuhl, T. Jorgas, S.M. Kurz, S. Rose-John, Y. Yokota, and M. Zenke. 2003. Transcriptional profiling identifies Id2 function in dendritic cell development. *Nature immunology* 4:380-386.
- Hashimoto, D., J. Miller, and M. Merad. 2011. Dendritic cell and macrophage heterogeneity in vivo. *Immunity* 35:323-335.
- Heath, W.R., G.T. Belz, G.M. Behrens, C.M. Smith, S.P. Forehan, I.A. Parish, G.M. Davey, N.S. Wilson, F.R. Carbone, and J.A. Villadangos. 2004. Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. *Immunological reviews* 199:9-26.
- Hedrick, J.A., V. Saylor, D. Figueroa, L. Mizoue, Y. Xu, S. Menon, J. Abrams, T. Handel, and A. Zlotnik. 1997. Lymphotoxin is produced by NK cells and attracts both NK cells and T cells in vivo. *J. Immunol.* 158:1533-1540.
- Henri, S., C. Siret, P. Machy, A. Kissenpfennig, B. Malissen, and L. Leserman. 2007. Mature DC from skin and skin-draining LN retain the ability to acquire and efficiently present targeted antigen. *Eur. J. Immunol.* 37:1184-1193.
- Henri, S., L.F. Poulin, S. Tamoutounour, L. Ardouin, M. Guillemins, B. de Bovis, E. Devilard, C. Viret, H. Azukizawa, A. Kissenpfennig, and B. Malissen. 2010. CD207⁺ CD103⁺ dermal dendritic cells cross-present keratinocyte-derived antigens irrespective of the presence of Langerhans cells. *J. Exp. Med.* 207:189-206.
- Hestdal, K., F.W. Ruscetti, J.N. Ihle, S.E. Jacobsen, C.M. Dubois, W.C. Kopp, D.L. Longo, and J.R. Keller. 1991. Characterization and regulation of RB6-8C5 antigen expression on murine bone marrow cells. *J. Immunol.* 147:22-28.
- Hildner, K., B.T. Edelson, W.E. Purtha, M. Diamond, H. Matsushita, M. Kohyama, B. Calderon, B.U. Schraml, E.R. Unanue, M.S. Diamond, R.D. Schreiber, T.L. Murphy, and K.M. Murphy. 2008. Batf3 deficiency reveals a critical role for CD8 α ⁺ dendritic cells in cytotoxic T cell immunity. *Science* 322:1097-1100.
- Hochrein, H., K. Shortman, D. Vremec, B. Scott, P. Hertzog, and M. O'Keeffe. 2001. Differential production of IL-12, IFN- α , and IFN- γ by mouse dendritic cell subsets. *J. Immunol.* 166:5448-5455.
- Hoeffel, G., A.C. Ripoché, D. Matheoud, M. Nascimbeni, N. Escriou, P. Lebon, F. Heshmati, J.G. Guillet, M. Gannagé, S. Caillat-Zucman, N. Casartelli, O. Schwartz, H. De la Salle, D. Hanau, A. Hosmalin, and C. Marañón. 2007. Antigen crosspresentation by human plasmacytoid dendritic cells. *Immunity* 27:481-492.

- Hogquist, K.A., S.C. Jameson, W.R. Heath, J.L. Howard, M.J. Bevan, und F.R. Carbone. 1994. T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell* 76:17-27.
- Holtshke, T., J. Lohler, Y. Kanno, T. Fehr, N. Giese, F. Rosenbauer, J. Lou, K.P. Knobloch, L. Gabriele, J.F. Waring, M.F. Bachmann, R.M. Zinkernagel, H.C. Morse, 3rd, K. Ozato, und I. Horak. 1996. Immunodeficiency and chronic myelogenous leukemia-like syndrome in mice with a targeted mutation of the ICSBP gene. *Cell* 87:307-317.
- Huysamen, C., J.A. Willment, K.M. Dennehy, und G.D. Brown. 2008. CLEC9A is a novel activation C-type lectin-like receptor expressed on BDCA3⁺ dendritic cells and a subset of monocytes. *J. Biol. Chem.* 283:16693-16701.
- Iyoda, T., S. Shimoyama, K. Liu, Y. Omatsu, Y. Akiyama, Y. Maeda, K. Takahara, R.M. Steinman, und K. Inaba. 2002. The CD8⁺ dendritic cell subset selectively endocytoses dying cells in culture and in vivo. *J. Exp. Med.* 195:1289-1302.
- Jaensson, E., H. Uronen-Hansson, O. Pabst, B. Eksteen, J. Tian, J.L. Coombes, P.L. Berg, T. Davidsson, F. Powrie, B. Johansson-Lindbom, und W.W. Agace. 2008. Small intestinal CD103⁺ dendritic cells display unique functional properties that are conserved between mice and humans. *J. Exp. Med.* 205:2139-2149.
- Jiang, W., W.J. Swiggard, C. Heufler, M. Peng, A. Mirza, R.M. Steinman, und M.C. Nussenzweig. 1995. The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature* 375:151-155.
- Jongbloed, S.L., A.J. Kassianos, K.J. McDonald, G.J. Clark, X. Ju, C.E. Angel, C.J. Chen, P.R. Dunbar, R.B. Wadley, V. Jeet, A.J. Vulink, D.N. Hart, und K.J. Radford. 2010. Human CD141⁺ (BDCA-3)⁺ dendritic cells (DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens. *J. Exp. Med.* 207:1247-1260.
- Jung, S., J. Aliberti, P. Graemmel, M.J. Sunshine, G.W. Kreutzberg, A. Sher, und D.R. Littman. 2000. Analysis of fractalkine receptor CX₃CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. *Molecular and cellular biology* 20:4106-4114.
- Jung, S., D. Unutmaz, P. Wong, G. Sano, K. De los Santos, T. Sparwasser, S. Wu, S. Vuthoori, K. Ko, F. Zavala, E.G. Pamer, D.R. Littman, und R.A. Lang. 2002. In vivo depletion of CD11c⁺ dendritic cells abrogates priming of CD8⁺ T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity* 17:211-220.
- Kashiwada, M., N.L. Pham, L.L. Pewe, J.T. Harty, und P.B. Rothman. 2011. NFIL3/E4BP4 is a key transcription factor for CD8 α dendritic cell development. *Blood* 117:6193-6197.
- Kelner, G.S., J. Kennedy, K.B. Bacon, S. Kleyensteuber, D.A. Largaespada, N.A. Jenkins, N.G. Copeland, J.F. Bazan, K.W. Moore, T.J. Schall, et al. 1994. Lymphotactin: a cytokine that represents a new class of chemokine. *Science* 266:1395-1399.
- Kennedy, J., G.S. Kelner, S. Kleyensteuber, T.J. Schall, M.C. Weiss, H. Yssel, P.V. Schneider, B.G. Cocks, K.B. Bacon, und A. Zlotnik. 1995. Molecular cloning and functional characterization of human lymphotactin. *J. Immunol.* 155:203-209.
- Kilshaw, P.J., und S.J. Murant. 1990. A new surface antigen on intraepithelial lymphocytes in the intestine. *Eur. J. Immunol.* 20:2201-2207.

- Kissenpfennig, A., S. Ait-Yahia, V. Clair-Moninot, H. Stossel, E. Badell, Y. Bordat, J.L. Pooley, T. Lang, E. Prina, I. Coste, O. Gresser, T. Renno, N. Winter, G. Milon, K. Shortman, N. Romani, S. Lebecque, B. Malissen, S. Saeland, und P. Douillard. 2005. Disruption of the langerin/CD207 gene abolishes Birbeck granules without a marked loss of Langerhans cell function. *Molecular and cellular biology* 25:88-99.
- Kohrgruber, N., N. Halanek, M. Groger, D. Winter, K. Rappersberger, M. Schmitt-Egenolf, G. Stingl, und D. Maurer. 1999. Survival, maturation, and function of CD11c⁻ and CD11c⁺ peripheral blood dendritic cells are differentially regulated by cytokines. *J. Immunol.* 163:3250-3259.
- Kraal, G., M. Breel, M. Janse, und G. Bruin. 1986. Langerhans' cells, veiled cells, and interdigitating cells in the mouse recognized by a monoclonal antibody. *J. Exp. Med.* 163:981-997.
- Kretz-Rommel, A., F. Qin, N. Dakappagari, R. Torensma, S. Faas, D. Wu, und K.S. Bowdish. 2007. In vivo targeting of antigens to human dendritic cells through DC-SIGN elicits stimulatory immune responses and inhibits tumor growth in grafted mouse models. *Journal of immunotherapy* 30:715-726.
- Lahoud, M.H., A.I. Proietto, K.H. Gartlan, S. Kitsoulis, J. Curtis, J. Wettenhall, M. Sofi, C. Daunt, M. O'Keeffe, I. Caminschi, K. Satterley, A. Rizzitelli, P. Schnorrer, A. Hinohara, Y. Yamaguchi, L. Wu, G. Smyth, E. Handman, K. Shortman, und M.D. Wright. 2006. Signal regulatory protein molecules are differentially expressed by CD8⁺ dendritic cells. *J. Immunol.* 177:372-382.
- Lin, M.L., Y. Zhan, A.I. Proietto, S. Prato, L. Wu, W.R. Heath, J.A. Villadangos, und A.M. Lew. 2008. Selective suicide of cross-presenting CD8⁺ dendritic cells by cytochrome c injection shows functional heterogeneity within this subset. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 105:3029-3034.
- Lindstedt, M., K. Lundberg, und C.A. Borrebaeck. 2005. Gene family clustering identifies functionally associated subsets of human in vivo blood and tonsillar dendritic cells. *J. Immunol.* 175:4839-4846.
- Liu, K., und M.C. Nussenzweig. 2010. Origin and development of dendritic cells. *Immunological reviews* 234:45-54.
- Löhning, M., A. Hutloff, T. Kallinich, H.W. Mages, K. Bonhagen, A. Radbruch, E. Hamelmann, und R.A. Kroczeck. 2003. Expression of ICOS in vivo defines CD4⁺ effector T cells with high inflammatory potential and a strong bias for secretion of interleukin 10. *J. Exp. Med.* 197:181-193.
- MacDonald, K.P., D.J. Munster, G.J. Clark, A. Dzionek, J. Schmitz, und D.N. Hart. 2002. Characterization of human blood dendritic cell subsets. *Blood* 100:4512-4520.
- Mach, N., S. Gillessen, S.B. Wilson, C. Sheehan, M. Mihm, und G. Dranoff. 2000. Differences in dendritic cells stimulated in vivo by tumors engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor or Flt3-ligand. *Cancer research* 60:3239-3246.
- Maldonado-Lopez, R., T. De Smedt, P. Michel, J. Godfroid, B. Pajak, C. Heirman, K. Thielemans, O. Leo, J. Urbain, und M. Moser. 1999. CD8α⁺ and CD8α⁻ subclasses of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells in vivo. *J. Exp. Med.* 189:587-592.
- Maraskovsky, E., K. Brasel, M. Teepe, E.R. Roux, S.D. Lyman, K. Shortman, und H.J. McKenna. 1996. Dramatic increase in the numbers of functionally mature dendritic cells in Flt3 ligand-treated mice: multiple dendritic cell subpopulations identified. *J. Exp. Med.* 184:1953-1962.

- McKenna, H.J., K.L. Stocking, R.E. Miller, K. Brasel, T. De Smedt, E. Maraskovsky, C.R. Maliszewski, D.H. Lynch, J. Smith, B. Pulendran, E.R. Roux, M. Teepe, S.D. Lyman, and J.J. Peschon. 2000. Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells. *Blood* 95:3489-3497.
- Meager A. 1987. Antibodies against interferons: Characterization of interferons and immunoassays. In: Clemens MJ, Morris AG, Gearing AJH, editors. Lymphokines and interferons: A practical approach. *Oxford: IRL Press*; 105–127.
- Miltenyi, S., W. Müller, W. Weichel, und A. Radbruch. 1990. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* 11:231-238.
- Mittag, D., A.I. Proietto, T. Loudovaris, S.I. Mannering, D. Vremec, K. Shortman, L. Wu, und L.C. Harrison. 2011. Human dendritic cell subsets from spleen and blood are similar in phenotype and function but modified by donor health status. *J. Immunol.* 186:6207-6217.
- Müller, S., B. Dörner, U. Korthauer, H.W. Mages, M. D'Apuzzo, G. Senger, und R.A. Kroczeck. 1995. Cloning of ATAC, an activation-induced, chemokine-related molecule exclusively expressed in CD8⁺ T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 25:1744-1748.
- Murphy, P.M., M. Baggiolini, I.F. Charo, C.A. Hébert, R. Horuk, K. Matsushima, L.H. Miller, J.J. Oppenheim, und C.A. Power. 2000. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacological reviews* 52:145-176.
- Nussenzweig, M.C., R.M. Steinman, J.C. Unkeless, M.D. Witmer, B. Gutchinov, und Z.A. Cohn. 1981. Studies of the cell surface of mouse dendritic cells and other leukocytes. *J. Exp. Med.* 154:168-187.
- Neuenhahn, M., K.M. Kerksiek, M. Nauerth, M.H. Suhre, M. Schiemann, F.E. Gebhardt, C. Stemberger, K. Panthel, S. Schröder, T. Chakraborty, S. Jung, H. Hochrein, H. Rüssmann, T. Brocker, und D.H. Busch. 2006. CD8 α^+ dendritic cells are required for efficient entry of *Listeria monocytogenes* into the spleen. *Immunity* 25:619-630.
- O'Doherty, U., R.M. Steinman, M. Peng, P.U. Cameron, S. Gezelter, I. Kopeloff, W.J. Swiggard, M. Pope, und N. Bhardwaj. 1993. Dendritic cells freshly isolated from human blood express CD4 and mature into typical immunostimulatory dendritic cells after culture in monocyte-conditioned medium. *J. Exp. Med.* 178:1067-1076.
- Ohl, L., M. Mohaupt, N. Czeloth, G. Hintzen, Z. Kiafard, J. Zwirner, T. Blankenstein, G. Henning, und R. Förster. 2004. CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions. *Immunity* 21:279-288.
- O'Keeffe, M., H. Hochrein, D. Vremec, I. Caminschi, J.L. Miller, E.M. Anders, L. Wu, M.H. Lahoud, S. Henri, B. Scott, P. Hertzog, L. Tatarczuch, und K. Shortman. 2002. Mouse plasmacytoid cells: long-lived cells, heterogeneous in surface phenotype and function, that differentiate into CD8⁺ dendritic cells only after microbial stimulus. *J. Exp. Med.* 196:1307-1319.
- Ortega, G., R.J. Robb, E.M. Shevach, und T.R. Malek. 1984. The murine IL 2 receptor. I. Monoclonal antibodies that define distinct functional epitopes on activated T cells and react with activated B cells. *J. Immunol.* 133:1970-1975.
- Osugi, Y., S. Vuckovic, und D.N. Hart. 2002. Myeloid blood CD11c⁺ dendritic cells and monocyte-derived dendritic cells differ in their ability to stimulate T lymphocytes. *Blood* 100:2858-2866.

- Piccioli, D., S. Tavarini, E. Borgogni, V. Steri, S. Nuti, C. Sammiceli, M. Bardelli, D. Montagna, F. Locatelli, und A. Wack. 2007. Functional specialization of human circulating CD16 and CD1c myeloid dendritic-cell subsets. *Blood* 109:5371-5379.
- Pooley, J.L., W.R. Heath, und K. Shortman. 2001. Cutting edge: intravenous soluble antigen is presented to CD4 T cells by CD8⁻ dendritic cells, but cross-presented to CD8 T cells by CD8⁺ dendritic cells. *J. Immunol.* 166:5327-5330.
- Poulin, L.F., M. Salio, E. Griessinger, F. Anjos-Afonso, L. Craciun, J.L. Chen, A.M. Keller, O. Joffre, S. Zelenay, E. Nye, A. Le Moine, F. Faure, V. Donckier, D. Sancho, V. Cerundolo, D. Bonnet, und C. Reis e Sousa. 2010. Characterization of human DNGR-1⁺ BDCA3⁺ leukocytes as putative equivalents of mouse CD8 α ⁺ dendritic cells. *J. Exp. Med.* 207:1261-1271.
- Pulendran, B., J.L. Smith, G. Caspary, K. Brasel, D. Pettit, E. Maraskovsky, und C.R. Maliszewski. 1999. Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 96:1036-1041.
- Qiu, C.H., Y. Miyake, H. Kaise, H. Kitamura, O. Ohara, und M. Tanaka. 2009. Novel subset of CD8 α ⁺ dendritic cells localized in the marginal zone is responsible for tolerance to cell-associated antigens. *J. Immunol.* 182:4127-4136.
- Reid, C.D., A. Stackpoole, A. Meager, und J. Tikerpae. 1992. Interactions of tumor necrosis factor with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and other cytokines in the regulation of dendritic cell growth in vitro from early bipotent CD34⁺ progenitors in human bone marrow. *J. Immunol.* 149:2681-2688.
- Robbins, S.H., T. Walzer, D. Demb le, C. Thibault, A. Defays, G. Bessou, H. Xu, E. Vivier, M. Sellars, P. Pierre, F.R. Sharp, S. Chan, P. Kastner, und M. Dalod. 2008. Novel insights into the relationships between dendritic cell subsets in human and mouse revealed by genome-wide expression profiling. *Genome Biol.* 9:R17.
- Robinson, S.P., S. Patterson, N. English, D. Davies, S.C. Knight, und C.D. Reid. 1999. Human peripheral blood contains two distinct lineages of dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 29:2769-2778.
- Rollins, B.J. 1997. Chemokines. *Blood* 90:909-928.
- Romani, N., S. Gruner, D. Brang, E. K mpgen, A. Lenz, B. Trockenbacher, G. Konwalinka, P.O. Fritsch, R.M. Steinman, und G. Schuler. 1994. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J. Exp. Med.* 180:83-93.
- Sallusto, F., und A. Lanzavecchia. 1994. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J. Exp. Med.* 179:1109-1118.
- Sancho, D., D. Mourao-S , O.P. Joffre, O. Schulz, N.C. Rogers, D.J. Pennington, J.R. Carlyle, und C. Reis e Sousa. 2008. Tumor therapy in mice via antigen targeting to a novel, DC-restricted C-type lectin. *The Journal of clinical investigation* 118:2098-2110.
- Sathe, P., J. Pooley, D. Vremec, J. Mintern, J.O. Jin, L. Wu, J.Y. Kwak, J.A. Villadangos, und K. Shortman. 2011. The acquisition of antigen cross-presentation function by newly formed dendritic cells. *J. Immunol.* 186:5184-5192.

- Schiavo, R., D. Baatar, P. Olkhanud, F.E. Indig, N. Restifo, D. Taub, und A. Biragyn. 2006. Chemokine receptor targeting efficiently directs antigens to MHC class I pathways and elicits antigen-specific CD8⁺ T-cell responses. *Blood* 107:4597-4605.
- Schiavoni, G., F. Mattei, P. Sestili, P. Borghi, M. Venditti, H.C. Morse, 3rd, F. Belardelli, und L. Gabriele. 2002. ICSBP is essential for the development of mouse type I interferon-producing cells and for the generation and activation of CD8 α ⁺ dendritic cells. *J. Exp. Med.* 196:1415-1425.
- Schnorrer, P., G.M. Behrens, N.S. Wilson, J.L. Pooley, C.M. Smith, D. El-Sukkari, G. Davey, F. Kupresanin, M. Li, E. Maraskovsky, G.T. Belz, F.R. Carbone, K. Shortman, W.R. Heath, und J.A. Villadangos. 2006. The dominant role of CD8⁺ dendritic cells in cross-presentation is not dictated by antigen capture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 103:10729-10734.
- Schnurr, M., Q. Chen, A. Shin, W. Chen, T. Toy, C. Jenderek, S. Green, L. Miloradovic, D. Drane, I.D. Davis, J. Villadangos, K. Shortman, E. Maraskovsky, und J. Cebon. 2005. Tumor antigen processing and presentation depend critically on dendritic cell type and the mode of antigen delivery. *Blood* 105:2465-2472.
- Schuler-Thurner, B., E.S. Schultz, T.G. Berger, G. Weinlich, S. Ebner, P. Woerl, A. Bender, B. Feuerstein, P.O. Fritsch, N. Romani, und G. Schuler. 2002. Rapid induction of tumor-specific type 1 T helper cells in metastatic melanoma patients by vaccination with mature, cryopreserved, peptide-loaded monocyte-derived dendritic cells. *J. Exp. Med.* 195:1279-1288.
- Schulz, O., und C. Reis e Sousa. 2002. Cross-presentation of cell-associated antigens by CD8 α ⁺ dendritic cells is attributable to their ability to internalize dead cells. *Immunology* 107:183-189.
- Segura, E., und J.A. Villadangos. 2009. Antigen presentation by dendritic cells *in vivo*. *Current opinion in immunology* 21:105-110.
- Shan, L., X. Qiao, E. Oldham, D. Catron, H. Kaminski, D. Lundell, A. Zlotnik, E. Gustafson, und J.A. Hedrick. 2000. Identification of viral macrophage inflammatory protein (vMIP)-II as a ligand for GPR5/XCR1. *Biochemical and biophysical research communications* 268:938-941.
- Shortman, K., und Y.J. Liu. 2002. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat. Rev. Immunol.* 2:151-161.
- Shortman, K., und S.H. Naik. 2007. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nat. Rev. Immunol.* 7:19-30.
- Shortman, K., und W.R. Heath. 2010. The CD8⁺ dendritic cell subset. *Immunological reviews* 234:18-31.
- Steinman, R.M., und Z.A. Cohn. 1973. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J. Exp. Med.* 137:1142-1162.
- Steinman, R.M. 2010. Some active areas of DC research und their medical potential. *Eur. J. Immunol.* 40:2085-2088.
- Steinman, R.M. 2012. Decisions about dendritic cells: past, present, and future. *Annual review of immunology* 30:1-22.

- Stievano, L., V. Tosello, N. Marcato, A. Rosato, A. Sebelin, L. Chieco-Bianchi, und A. Amadori. 2003. CD8⁺ $\gamma\delta$ ⁺ T cells that lack surface CD5 antigen expression are a major lymphotactin (XCL1) source in peripheral blood lymphocytes. *J. Immunol.* 171:4528-4538.
- Sung, S.S., S.M. Fu, C.E. Rose, Jr., F. Gaskin, S.T. Ju, und S.R. Beaty. 2006. A major lung CD103 (α_E)- β_7 integrin-positive epithelial dendritic cell population expressing Langerin and tight junction proteins. *J. Immunol.* 176:2161-2172.
- Tacke, P.J., I.J. de Vries, K. Gijzen, B. Joosten, D. Wu, R.P. Rother, S.J. Faas, C.J. Punt, R. Torensma, G.J. Adema, und C.G. Figdor. 2005. Effective induction of naive and recall T-cell responses by targeting antigen to human dendritic cells via a humanized anti-DC-SIGN antibody. *Blood* 106:1278-1285.
- Tacke, P.J., I.J. de Vries, R. Torensma, und C.G. Figdor. 2007. Dendritic-cell immunotherapy: from *ex vivo* loading to *in vivo* targeting. *Nat. Rev. Immunol.* 7:790-802.
- Thaiss, C.A., V. Semmling, L. Franken, H. Wagner, und C. Kurts. 2011. Chemokines: a new dendritic cell signal for T cell activation. *Frontiers in immunology* 2:31.
- Tomonari, K. 1988. A rat antibody against a structure functionally related to the mouse T-cell receptor/T3 complex. *Immunogenetics* 28:455-458.
- Tsujimura, H., T. Tamura, C. Gongora, J. Aliberti, C. Reis e Sousa, A. Sher, und K. Ozato. 2003. ICSBP/IRF-8 retrovirus transduction rescues dendritic cell development *in vitro*. *Blood* 101:961-969.
- Ugolini, V., G. Nunez, R.G. Smith, P. Stastny, und J.D. Capra. 1980. Initial characterization of monoclonal antibodies against human monocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 77:6764-6768.
- Villadangos, J.A., und W.R. Heath. 2005. Life cycle, migration and antigen presenting functions of spleen and lymph node dendritic cells: limitations of the Langerhans cells paradigm. *Seminars in immunology* 17:262-272.
- Villadangos, J.A., und P. Schnorrer. 2007. Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets *in vivo*. *Nat. Rev. Immunol.* 7:543-555.
- Villadangos, J.A., und L. Young. 2008. Antigen-presentation properties of plasmacytoid dendritic cells. *Immunity* 29:352-361.
- Vremec, D., J. Pooley, H. Hochrein, L. Wu, und K. Shortman. 2000. CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen. *J. Immunol.* 164:2978-2986.
- Vremec, D., M. O'Keeffe, H. Hochrein, M. Fuchsberger, I. Caminschi, M. Lahoud, und K. Shortman. 2007. Production of interferons by dendritic cells, plasmacytoid cells, natural killer cells, and interferon-producing killer dendritic cells. *Blood* 109:1165-1173.
- Wang, J.C., J.J. Kobbie, L. Zhang, M. Cochran, T.R. Mosmann, C.T. Ritchlin, und S.A. Quataert. 2009. An 11-color flow cytometric assay for identifying, phenotyping, and assessing endocytic ability of peripheral blood dendritic cell subsets in a single platform. *J. Immunol. Methods* 341:106-116.

- Wilson, N.S., G.M. Behrens, R.J. Lundie, C.M. Smith, J. Waithman, L. Young, S.P. Forehan, A. Mount, R.J. Steptoe, K.D. Shortman, T.F. de Koning-Ward, G.T. Belz, F.R. Carbone, B.S. Crabb, W.R. Heath, and J.A. Villadangos. 2006. Systemic activation of dendritic cells by Toll-like receptor ligands or malaria infection impairs cross-presentation and antiviral immunity. *Nature immunology* 7:165-172.
- Wu, L., and K. Shortman. 2005. Heterogeneity of thymic dendritic cells. *Seminars in immunology* 17:304-312.
- Yoshida, T., T. Imai, M. Kakizaki, M. Nishimura, and O. Yoshie. 1995. Molecular cloning of a novel C or gamma type chemokine, SCM-1. *FEBS letters* 360:155-159.
- Yoshida, T., T. Imai, S. Takagi, M. Nishimura, I. Ishikawa, T. Yaoi, and O. Yoshie. 1996. Structure and expression of two highly related genes encoding SCM-1/human lymphotactin. *FEBS letters* 395:82-88.
- Yoshida, T., T. Imai, M. Kakizaki, M. Nishimura, S. Takagi, and O. Yoshie. 1998. Identification of single C motif-1/lymphotactin receptor XCR1. *J. Biol. Chem.* 273:16551-16554.
- Zhan, Y., E.M. Carrington, A. van Nieuwenhuijze, S. Bedoui, S. Seah, Y. Xu, N. Wang, J.D. Mintern, J.A. Villadangos, I.P. Wicks, and A.M. Lew. 2011. GM-CSF increases cross-presentation and CD103 expression by mouse CD8⁺ spleen dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 41:2585-2595.

Danksagung

Ich danke Prof. Richard KroczeK für die interessante immunologische Fragestellung, die er mich hat bearbeiten lassen sowie die Unterstützung während meiner Doktorarbeit.

Prof. Richard Lucius danke ich für das freundliche Angebot der Betreuung meiner Doktorarbeit an der Humboldt-Universität zu Berlin. Dr. Michal Or-Guil möchte ich herzlich für die Begutachtung der vorliegenden Arbeit danken. Prof. Hanspeter Herzel und Prof. Christian Schmitz-Linneweber danke ich für die Teilnahme an meinem Prüfungskomitee.

Priv.-Doz. Patrizia Stoitzner danke ich für die fruchtbare Kollaboration und den schönen Aufenthalt in Innsbruck.

Allen Mitgliedern des Robert Koch Doktorandenkollegs danke ich für die Organisation zahlreicher Vorlesungen, Seminare und Workshops sowie für viele anregende Diskussionen.

Von ganzem Herzen möchte ich meinen Kollegen Evelyn Hartung und Steffen Güttler für die wundervoll harmonische Zusammenarbeit innerhalb des ATAC-Projektes danken. Ohne Euch hätte ich die langen Nächte der Aufarbeitung der humanen Proben, die Zeiten ohne zufriedenstellende Ergebnisse und all die Kongresse und Seminare nicht durchgestanden und nur halb so viel Spaß im Labor haben können. Ich danke Volker Henn für die anregenden Diskussionen, die Hilfestellungen im Projekt und das Korrigieren der vorliegenden Arbeit. Zudem hat die warme Atmosphäre des gesamten Labors dazu beigetragen, dass ich mich wissenschaftlich gut aufgenommen gefühlt habe.

Aus meinem privaten Umfeld möchte ich Janosch Lindhorst für all sein Verständnis danken.

Publikationen

Originalpublikationen

Bachem, A.*, S. Güttler*, E. Hartung*, F. Ebstein, M. Schaefer, A. Tannert, A. Salama, K. Movassaghi, C. Opitz, H.W. Mages, V. Henn, P.M. Kloetzel, S. Gurka, und R.A. KroczeK. 2010. Superior antigen cross-presentation and XCR1 expression define human CD11c⁺CD141⁺ cells as homologues of mouse CD8⁺ dendritic cells. *J Exp Med* 207:1273-1281.

Bachem, A.*, E. Hartung*, S. Güttler*, A. Mora, X. Zhou, A. Hegemann, M. Plantinga, E. Mazzini, P. Stoitzner, S. Gurka, V. Henn, H.W. Mages, und R.A. KroczeK. 2012. Expression of XCR1 Characterizes the Batf3-Dependent Lineage of Dendritic Cells Capable of Antigen Cross-Presentation. *Frontiers in immunology* 3:214.

* die Autoren leisteten einen gleichen Beitrag

Kongressbeiträge

Mora A., X. Zhou, **A. Bachem**, H.W. Mages., V. Henn, R.A. KroczeK. Highly specific antigen targeting to CD8⁺ DC via the chemokine receptor XCR1. 2nd European Congress of Immunology. 13. – 16.09.2009, Berlin (Poster)

Bachem A., S. Güttler, E. Hartung, F. Ebstein, M. Schaefer, A. Tannert, A. Salama, K. Movassaghi, C. Opitz, H.W. Mages, V. Henn, P.-M. Kloetzel, S. Gurka, R.A. KroczeK. Superior antigen cross presentation and XCR1 expression define human CD11c⁺CD141⁺ cells as homologues of murine CD8⁺ dendritic cells. 40th annual Meeting DGfI. 22.-25.09.2010. Leipzig (Poster)

Bachem A., S. Güttler, E. Hartung, V. Henn, S. Gurka, A. Hegemann, H.W. Mages, H. Weber, R.A. KroczeK. Phenotypic and functional analysis of XCR1-expressing, antigen cross-presenting DC in the mouse and the human. DC2010: Forum on Vaccine Science. 26.-30.09.2010, Lugano, Schweiz (Poster)

Bachem A. Tight correlation between XCR1 expression and antigen cross-presentation changes functional classification of splenic Dendritic cells. 2011 Joint Annual Meeting of SIICA and DGfI. 28.09.-01.10.2011, Riccione, Italien (Vortrag)

Weitere Vorträge

Bachem A. The functional role of the chemokine XCL1 and it's receptor XCR1 in the immune system. 05.11.2010, Department of Dermatology & Venereology, Innsbruck Medical University, Innsbruck, Österreich

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, Annabell Bachem, an Eides statt, die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt zu haben und alle verwendeten Hilfsmittel und Quellen als solche ausgewiesen zu haben.

Des Weiteren versichere ich, dass die vorliegende Arbeit nie in dieser oder anderer Form Gegenstand eines früheren Promotionsverfahrens war.

Die dem angestrebten Promotionsverfahren an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin zugrunde liegende Promotionsordnung ist mir bekannt.